

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA**

**Los dinucleósido polifosfatos son sintetizados, y se
comportan como aceptores, en la reacción catalizada por T4 RNA
ligasa**

**EVA ANA ATENCIA FERNÁNDEZ
Madrid, 2000**

M
T25.5
8555

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

**Los dinucleósido polifosfatos son sintetizados, y se
comportan como aceptores, en la reacción catalizada por T4 RNA
ligasa**

**Tesis que para optar al grado de Doctor en Medicina y Cirugía presenta la
Licenciada en Farmacia**

EVA ANA ATENCIA FERNÁNDEZ

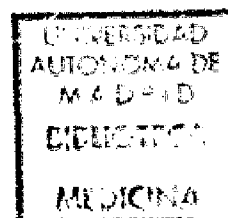
Directores: Prof. Antonio Sillero y Dra. M^a Antonia Günther

**Departamento de Bioquímica,
Instituto de Investigaciones Biomédicas, Alberto Sols.**

UAM - CSIC

Madrid, 2000

Res FM: 19755



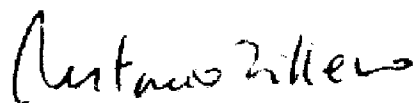
Antonio Sillero Repullo, Catedrático de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid.

Maria Antonia Günther Nonell, Investigador Científico del Instituto de Investigaciones Biomédicas, Alberto Sols. CSIC/UAM

CERTIFICAN:

Que el trabajo descrito en esta Tesis, ha sido realizado bajo nuestra dirección por la Licenciada en Farmacia Eva Ana Atencia Fernández, en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid. En nuestra opinión, y salvo mejor criterio del Tribunal que ha de juzgarle, este trabajo reúne las condiciones científicas exigidas para optar al grado de Doctor.

Madrid 29 de Mayo del 2000



Antonio Sillero



Maria Antonia Günther

*Del salón en el ángulo oscuro,
de su dueño tal vez olvidada,
silenciosa y cubierta de polvo,
veíase el arpa.
¡Cuanta nota dormida en sus cuerdas,
como el pájaro duerme en las ramas,
esperando la mano de nieve
que sabe arrancarla!
¡Ay!, pensé; ¡cuantas veces el genio
así duerme en el fondo del alma,
y una voz, como Lázaro, espera
que le diga: ¡Levántate y anda!*

Gustavo Adolfo Bécquer

A mis padres y a mis hermanos

Agradecimientos

Quiero empezar agradeciendo a mis directores de Tesis, los doctores Antonio Sillero y María Antonia Günther, todo el cariño y la confianza que me han dado. Con su gran espíritu científico han hecho que la realización de esta Tesis sea para mi, un juego apasionante como nunca hubiese imaginado. Y en ellos he tenido el ejemplo, que nunca quisiera olvidar, de que la verdadera inteligencia y sabiduría va siempre acompañada de sencillez y humildad.

Al departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid, en las personas de sus directores, Dr. Juan J. Aragón y Dr. Antonio Sillero, por las facilidades concedidas para la realización de este trabajo.

A mi tutora, la Dra. Rosa Sagarra y al Dr. Claudio Fernández de Heredia por su asequibilidad.

A los que han sido mis compañeros de laboratorio durante la realización de esta Tesis: Anabel, Olga, Paloma, Rui, Franklin, Alexey, Paco, Daniel, María, Myriam, Hocine, Raquel, Teresa, Alberto, Jara, Natalia, Eva Baragaño, Hugo, Elodie, Silvia, Eva Echaniz, Jorge, Maria João y Sonia, gracias por vuestra amistad.

A Javier Pérez por su ayuda en la realización de las figuras de este trabajo.

A Rosalía por su simpatía, optimismo y amistad.

A mis amigos de los cursos de doctorado: Cioly, Paco, Andrés, Ana, Alicia, David, Alberto, Mirna y a Juan Francisco por su amistad.

A mis amigos de otros laboratorios del Departamento de Bioquímica y del Instituto: Alicia, Gema, Susana, Carmita, Belén, Oscar, Cristina, Jesús, Jose, Marga, Juanjo, Gimena, Pablo, Yolanda, Cruz, Inma, Natalie, María, Ricardo, Raquel, Raúl, Carlos, Juan, Joaquín, Ana, Isabel, Marisa, etc...

A todo el personal que trabaja en el Departamento de Bioquímica y en el Instituto de Investigaciones Biomédicas.

A Eduardo Bergantiños, mi mejor amigo. Por su apoyo, colaboración, simpatía y amistad.

A mis padres, porque me habeis apoyado y animado siempre durante la realización de esta Tesis. Gracias por todo lo que nos dais a mi y a mis hermanos.

A mis hermanos: Marián, Javi, Nuria, Lucía, Rebeca, Sabela, y a mi tía Blanca, por vuestro apoyo y comprensión, por haber crecido conmigo, por lo bien que nos lo hemos pasado allá en Galicia y ahora aquí en Madrid.

A mis abuelos, por todo el cariño que nos dais; y al resto de mi familia, en especial a mi tía Eva.

RESUMEN

En este trabajo se describe la reacción de síntesis de (di)nucleósido polifosfatos catalizada por la T4 RNA ligasa (EC 6.5.1.3). La RNA ligasa del bacteriófago T4 cataliza reacciones inter- o intramoleculares con formación de enlaces fosfodiéster en el RNA o DNA. La formación de este enlace requiere ATP como cofactor y tiene lugar a través de un complejo intermediario E-AMP (E=enzima), con liberación de pirofosfato. La síntesis de (di)nucleósido polifosfatos ocurre como consecuencia del desplazamiento del AMP del complejo E-AMP por polifosfatos y por nucleósidos di- y trifosfatos. La síntesis de (di)nucleótidos requiere un catión divalente (Mg^{2+} o Mn^{2+}), tiene lugar a un pH óptimo de 7,4; es inhibida por Na^+ , K^+ y NH_4^+ , por el polifosfato P_{15} y por nucleósido 5',3'(2')-bisfosfatos. Estos bisfosfatos reaccionan con el complejo E-AMP para formar los derivados 5'-adenililados del nucleósido 5',(3'(2')) bisfosfato correspondiente (AppN(3'(2'))p). El derivado 5'-adenililado de la citidina-5',3'-bisfosfato (Ap_2Cp) (que se forma en presencia de ATP y pCp), es utilizado por la T4 RNA ligasa como sustrato para transferir el residuo pCp a los grupos 3'-OH del diguanosintetrafosfato (Gp_4G) dando lugar a Gp_4GpCp y a $pCpGp_4CpCp$ en una relación de 10:1. La caracterización del Gp_4GpCp se llevó a cabo por tratamiento con fosfodiesterasa y fosfatasa alcalina y por análisis (cromatográfico y espectrofotométrico) de los productos de reacción, por HPLC. Los valores de K_m aparentes calculados para el Gp_4G y el Ap_2Cp en esta reacción, fueron alrededor de 4 y 0,4 mM, respectivamente. La eficiencia relativa de los siguientes dinucleósidos polifosfatos como aceptores del pCp del compuesto Ap_2Cp fue la siguiente: Gp_4G (100); Gp_5G (101); Ap_4G (47); Ap_4A (39). Gp_2G , Gp_3G y Xp_4X no fueron sustratos de la reacción. Los dinucleótidos que contenían dos guaninas y al menos 4 fosfatos internos fueron los sustratos preferidos para aceptar pCp en la posición 3'-OH.

SUMMARY

This work describes the synthesis of (di)nucleoside polyphosphates catalyzed by T4 RNA ligase (EC 6.5.1.3). The RNA ligase of bacteriophage T4 catalyzes inter- and intramolecular reactions with formation of phosphodiester bonds in RNA and DNA. These reactions require ATP as cofactor, and occur with formation of the intermediary complex E-AMP (E = enzyme), and liberation of pyrophosphate. The synthesis of (di)nucleoside 5'-polyphosphates takes place by the displacement of the AMP from the E-AMP complex with polyphosphates and nucleoside di- and triphosphates. The synthesis of (di)nucleotides requires a divalent cation (Mg^{2+} or Mn^{2+}); the optimum pH value of the reaction is 7.4; it is inhibited by Na^+ , K^+ and NH_4^+ ions, by the polyphosphate P_{15} , and by nucleosides 3'(2'), 5'-bisphosphate. These bisphosphates are able to react with the complex E-AMP and form the corresponding 5'-adenylylated nucleoside 5',3'(2') bisphosphate ($AppN(3'(2')p)$). 5'-Adenylylated cytidine 5', 3'-bisphosphate (Ap_2Cp) synthesized in the presence of ATP and cytidine 3,5'-bisphosphate (pCp), is used as substrate by the T4 RNA ligase to transfer the pCp residue to the 3'-OH group(s) of diguanosine tetraphosphate (Gp_4G) giving rise to Gp_4GCp and $pCpGp_4GpCp$ in a ratio of around 10:1. The synthesized Gp_4GCp was characterized by treatment with snake venom phosphodiesterase and alkaline phosphatase and analysis (chromatographic position and UV spectra) of the reaction products by HPLC. The apparent K_m values measured for Gp_4G and Ap_2Cp in this reaction were around 4 mM and 0.4 mM, respectively. The relative efficiencies of the following nucleoside (5') oligophospho (5') nucleoside as acceptors of cytidine 3',5'-bisphosphate from Ap_2Cp are indicated in parentheses: Gp_4G (100); Gp_5G (101); Ap_4G (47); Ap_4A (39). Gp_2G , Gp_3G and Xp_4X were not substrates of the reaction. Dinucleotides containing two guanines and at least four inner phosphates were the preferred acceptors of pCp at their 3'-OH group(s).

RESUMEN / SUMMARY

INDICE

	I
Abreviaturas	IV
Lista de Figuras	V
Lista de Tablas	VI
1. INTRODUCCION	
1.1. ESTRUCTURA Y DISTRIBUCIÓN DE LOS (DI)NUCLEÓSIDO POLIFOSFATOS	1
1.1.a. Estructura	1
1.1.b. Distribución	1
1.2. METABOLISMO DE LOS (DI)NUCLEÓSIDO POLIFOSFATOS	4
1.2.a. Degradación	4
1.2.a.1. Dinucleósido trifosfatasa (EC 3.6.1.29)	4
1.2.a.2. Dinucleósido tetrafosfatasa asimétrica (EC 3.6.1.17)	5
1.2.a.3. Dinucleósido tetrafosfatasa simétrica (EC 3.6.1.41)	6
1.2.a.4. Dinucleósido tetrafosfato fosfonilasa (EC 2.7.7.53)	6
1.2.a.5. Ap ₂ A hidrolasas	6
1.2.a.6. Np ₄ N y Np ₃ N hidrolasas y su relación con la familia de proteínas HIT o GAFH	7
1.2.a.7. Np ₄ N' hidrolasas y las proteínas MutT o hidrolasas Nudix	8
1.2.b. Síntesis de dinucleósido polifosfatos	9
1.2.b.1. Luciferasa de luciérnaga (EC 1.13.12.7)	10
1.2.b.2. Acetil-CoA sintetasa (EC 6.2.1.1) y acil CoA sintetasa (EC 6.2.1.8)	11
1.2.b.3. T4 DNA ligasa (EC 6.5.1.1)	12
1.3. PAPEL BIOLÓGICO DE LOS (DI)NUCLEÓSIDO POLIFOSFATOS	13
1.3.a. Dinucleósido polifosfatos como efectores enzimáticos	13
1.3.b. Dinucleósido polifosfatos como "alarmonas"	14
1.3.c. Dinucleósido polifosfatos y diferenciación celular	14
1.3.d. Interacción con receptores celulares	15
1.3.e. Funciones extracelulares de los dinucleósido polifosfatos	15
2. OBJETIVOS	17
3. MATERIALES Y METODOS	18
3.1 MATERIALES	18
3.1.a. Aparatos	18
3.1.b. Productos	18
3.2 MÉTODOS	19
3.2.a. Síntesis de (di)nucleósido polifosfatos	19
3.2.a.1. Utilizando T4 RNA ligasa	19
3.2.b. Análisis y cuantificación de (di)nucleótidos	20
3.2.b.1. Por cromatografía en capa fina (TLC)	20

3.2.b.2 Por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	21
3.2.c T4 RNA ligasa	21
3.2.c.1 Formación del complejo T4 RNA ligasa-AMP. Análisis por electroforesis en gel	21
3.2.c.2 Síntesis de Gp4GpCp y pCpGp4GpCp	22
3.2.c.3 Purificación y caracterización de Gp4GpCp	22
a) tratamiento con fosfatasa alcalina y fosfodiesterasa	22
b) tratamiento con fosfodiesterasa y fosfatasa alcalina	23
c) tratamiento con KOH	23
3.2.d Otros métodos	23
3.2.e.1 Síntesis de Xp _n X	23
3.2.e.2. Síntesis de Ap _n G	24
3.2.e.3 Eliminación del sulfato amónico de la pirofosfatasa comercial	24
3.2.e.4 Análisis por electroforesis en gel de distintas preparaciones comerciales de T4 RNA ligasa	25
3.2.e.5. Determinación de proteínas	25
4. RESULTADOS	26
4.1 SÍNTESIS DE (DI)NUCLEÓSIDO POLIFOSFATOS CATALIZADA POR LA T4 RNA LIGASA	26
4.1.a Formación del complejo E-AMP y su desplazamiento por P ₃	27
4.1.b Síntesis de Ap _n A catalizada por T4RNA ligasa	27
4.1.b.1 Linealidad con el tiempo e influencia de la pirofosfatasa	27
4.1.b.2 Caracterización del Ap _n A formado	27
4.1.b.3 Determinación de la constante de afinidad para el ATP en la síntesis de Ap _n A	30
4.1.b.4. Influencia de la concentración de Mg ²⁺	30
4.1.c Síntesis de Ap _n G catalizada por la T4 RNA ligasa	33
4.1.c.1. Determinación de la constante de afinidad para el GTP en la síntesis de Ap _n G	33
4.1.c.2. pH óptimo	33
4.1.c.3. Influencia de la concentración de Mg ²⁺	34
4.1.d. Polifosfatos como sustratos de la T4 RNA ligasa. Síntesis de p _n A y p ₃ A	34
4.1.e Especificidad de sustrato	38
4.1.e.1 Nucleótidos capaces de formar E-NMP (NMP=nucleósido monofosfato)	38
4.1.e.2 Nucleósidos trifosfatos como aceptores del AMP del E-AMP	38
4.1.e.3 Nucleósidos difosfatos como aceptores del AMP del E-AMP	41
4.1.e.4 ATP _γ S como sustrato de la T4 RNA ligasa	41
4.1.e.4.i. Síntesis de Ap _n N en presencia de ATP _γ S	44

4.1.e.4.ii. Síntesis de Ap_2A en presencia de $ATP\gamma S$	46
4.1.f. Efectores de la reacción de síntesis de (di)nucleósido polifosfatos	46
4.1.f.1. Cationes divalentes	46
4.1.f.2. Cationes monovalentes	49
4.1.f.3. Sulfato amónico	49
4.1.f.4. Polifosfato P_{15}	52
4.1.f.5. Suramina	56
4.1.f.6. Pindoxal 5'-fosfato	56
4.1.g. Inhibición de la síntesis de dinucleósido polifosfatos por ribonucleótidos 5', 3' (2')-bisfosfatos	56
4.2. DINUCLEÓSIDO POLIFOSFATOS COMO ACEPTORES DE pCp DEL Ap_2Cp	62
4.2.a. Gp_4G como un RNA aceptor potencial	63
4.2.b. Síntesis y caracterización de $GppppG-3'-p-5'-C-3'-p$ (Gp_4GpCp)	66
4.2.c. Síntesis y caracterización de $p-3'-C-5'-p-3'-GppppG-3'-p-5'-C-3'-p$ ($pCpGp_4GpCp$)	69
4.2.d. Características de la reacción de síntesis de Gp_4GpCp	72
4.2.d.1. Influencia de la pirofosfatasa y del sulfato amónico	72
4.2.d.2. Linealidad con el tiempo	72
4.2.d.3. Linealidad con la cantidad de enzima	72
4.2.d.4. Síntesis de Ap_2Cp . Linealidad con el tiempo.	72
4.2.d.5. Determinación de la K_m aparente para el Gp_4G	75
4.2.d.6. Determinación de la K_m aparente para el Ap_2Cp	75
4.2.e. Especificidad de los dinucleósido pirofosfatos como aceptores de pCp	79
4.2.e.1. Polifosfatos de diguanosina con distinta longitud de cadena	79
4.2.e.2. Dinucleósido polifosfatos con distinto tipo de base	81
4.2.f. Breve resumen de otros resultados en los que se intentó ligar Gp_4G a otros compuestos	81
5. DISCUSION	84
6. CONCLUSIONES	89
7. BIBLIOGRAFIA	91

ABREVIATURAS

Ado	Adenosina
Ap ₂ A	Adenosina (5') difosfo (5') adenosina ó diadenosina 5',5'''-P ₁ ,P ₂ -difosfato ó diadenosina difosfato
Ap ₃ A	Adenosina (5') trifosfo (5') adenosina
Ap ₄ A	Adenosina (5') tetrafosfo (5') adenosina
Ap ₅ A	Adenosina (5') pentafosfo (5') adenosina
Ap ₂ Cp	5'-adenililada citidina 5',3'-bisfosfato
Ap ₄ dA	Adenosina (5') tetrafosfo (5')-2'-deoxiadenosina
Ap ₄ ddA	Adenosina (5') tetrafosfo (5')-2',3'-dideoxiadenosina
Ap ₄ G	Adenosina (5') tetrafosfo (5') guanosina
Ap ₄ N	Adenosina (5') tetrafosfo (5') nucleósido
ATP _γ S	Adenosina 5'-γ-tiotrifosfato
dAp ₄ ddA	2'-Deoxiadenosina (5') tetrafosfo (5')-2',3'-dideoxiadenosina
Gp ₃ G	Guanosina (5') trifosfo (5') guanosina
Gp ₄ G	Guanosina (5') tetrafosfo (5') guanosina
Gp ₄ GpCp	GppppG-3'-5'-C-3'p
Gp ₅ G	Guanosina (5') pentafosfo (5') guanosina
Np _n N	Nucleósido (5') n-fosfo (5') nucleósido
NTP	Nucleósido trifosfato
P ₁₅	Polifosfato de longitud de cadena de 15 fosfatos
P ₃	Tripolifosfato
pAp	Adenosina 5',3'-bisfosfato
pA2'p	Adenosina 5',2'-bisfosfato
pCp	Citidina 5',3'-bisfosfato
pCpGp ₄ GpCp	p-3-C-5'-p-3'-GppppG-3'-5'-C-3'p
p ₄ A	Adenosina 5'-tetrafosfato
TBA	Bromuro de tetrabutilamonio
U	Unidad de actividad enzimática

Enzimas

Fosfatasa alcalina	EC 3.1.3.1
Fosfodiesterasa I de veneno de serpiente	EC 3.1.4.1
Pirfosfatasa inorgánica	EC 3.6.1.1
T4 DNA ligasa	EC 6.5.1.1
T4 RNA ligasa	EC 6.5.1.3

Lista de Figuras

Figura 1. Fórmula desarrollada de diadenosina tetrafosfato (Ap_4A)	2
Figura 2. Inhibición de la formación del complejo T4 RNA ligasa-AMP por tripolifosfato (P_3)	28
Figura 3. Síntesis de Ap_4A catalizada por T4 RNA ligasa linealidad con el tiempo e influencia de la pirofosfatasa	29
Figura 4. Síntesis de Ap_4A por T4 RNA ligasa y caracterización	31
Figura 5. Síntesis de Ap_4A catalizada por T4 RNA ligasa. Dependencia de la concentración de Mg^{2+}	32
Figura 6. Efecto del valor del pH en la síntesis de Ap_4G catalizada por T4 RNA ligasa	35
Figura 7. Óptimo de Mg^{2+} en la síntesis de Ap_4G catalizada por T4 RNA ligasa	36
Figura 8. Polifosfatos como sustratos de la T4 RNA ligasa	37
Figura 9. Síntesis de Ap_4Ns y p_4A por T4 RNA ligasa	39
Figura 10. Síntesis de $ddAp_4A$ con T4 RNA ligasa	40
Figura 11. Síntesis de Ap_3Ns catalizada por T4 RNA ligasa	42
Figura 12. Espectros de absorción de Ap_3Ns	43
Figura 13. $ATPyS$ como sustrato de la T4 RNA ligasa	45
Figura 14. Síntesis comparativa de Ap_3A a partir de ADP y ATP o $ATPyS$	48
Figura 15. Inhibición por $ZnCl_2$ de la síntesis de Ap_4G catalizada por T4 RNA ligasa	50
Figura 16. Efecto de concentraciones crecientes de KCl, NaCl o LiCl sobre la síntesis de Ap_4A catalizada por T4 RNA ligasa	51
Figura 17. Efecto de la adición de pirofosfatasa y de sulfato amónico sobre la síntesis de Ap_4A	53
Figura 18. Inhibición por sulfato amónico de la síntesis de Ap_4A	54
Figura 19. Inhibición por P_{15} de la síntesis de Ap_4A	55
Figura 20. Inhibición de la síntesis de Ap_4G por piridoxal 5'-P	57
Figura 21. Inhibición de la síntesis de Ap_4A por nucleósidos 3'(2'),5'-Bisfosfatos	60
Figura 22. Síntesis de Ap_2Cp , Ap_2Ap , $Ap_2A2'p$ o Ap_4A con T4 RNA ligasa: linealidad con el tiempo	61
Figura 23. Síntesis de un citidil derivado de diguanosina tetrafosfato catalizado por T4 RNA ligasa	64
Figura 24. Purificación de Gp_4GpCp	66

Figura 25. Caracterización del Gp_4GpCp. Tratamiento con fosfatasa alcalina y fosfodiesterasa	67
Figura 26. Espectros ultravioleta del Gp_4GpCp y de sus productos de degradación después del tratamiento con fosfatasa alcalina y fosfodiesterasa	70
Figura 27. Caracterización del Gp_4GpCp. Tratamiento con 0.3 N KOH y fosfatasa alcalina	71
Figura 28. Síntesis de Gp_4GpCp. Linealidad con el tiempo	73
Figura 29. Síntesis de Gp_4GpCp. Linealidad con la cantidad de enzima	74
Figura 30. Síntesis de Ap_2Cp. Linealidad en el tiempo	76
Figura 31. Influencia de la concentración de Gp_4G en la síntesis de Gp_4GpCp	77
Figura 32. Influencia de la concentración de Ap_2Cp en la síntesis de Gp_4GpCp	78
Figura 33. Especificidad de los diguanosina polifosfatos como sustratos aceptores de pCp	80
Figura 34. Especificidad de los dinucleósido tetrafosfatos como sustratos aceptores de pCp	82
 Lista de Tablas	
Tabla 1. Síntesis relativa de Ap_4A en presencia de Mg^{2+}, Mn^{2+} o Ca^{2+}	47

1. INTRODUCCION

En esta memoria se presenta el estudio hecho sobre la síntesis de (di)nucleósidos polifosfatos catalizada por T4 RNA ligasa. Puesto que este trabajo se encuadra dentro de un objetivo más amplio que pretende conocer el papel biológico de estos compuestos y más concretamente sus posibles vías de síntesis *in vivo*, se hará a continuación un breve resumen recogiendo lo más significativo del conocimiento actual sobre este tema.

1.1 ESTRUCTURA Y DISTRIBUCION DE LOS (DI)NUCLEOSIDO POLIFOSFATOS

1.1.a Estructura

Los dinucleósido polifosfatos (Np_nN) son moléculas constituidas por dos residuos nucleosídicos (N), iguales o distintos, unidos entre si por los extremos 5'-hidroxilo, a través de una cadena de fosfatos (Fig.1). Se les denomina homo- o heterodinucleótidos según que los residuos nucleosídicos sean iguales o diferentes. Según la Union Internacional de Bioquímica estos compuestos deben nombrarse como nucleósido(5')oligofosfo(5')nucleósido o $P^1.P^n$ -bis (5'-nucleosidil) oligofosfato (Holler, 1992), si bien es frecuente encontrar los términos diguanosina tetrafosfato o diadenosina trifosfato para referirse, por ejemplo, al Gp_4G o Ap_3A , respectivamente.

Por nucleósido polifosfatos se conocen aquellos compuestos que tienen una cadena de al menos 4 o más fosfatos unida al extremo 5'-hidroxilo de un nucleósido. Los más comunes son el adenosina 5'-tetrafosfato (p_4A) y el adenosina 5'-pentafosfato (Zamecnik & Stephenson, 1969; Ortiz & col. 1993; Jakubowski, 1986; Sillero & col., 1994).

1.1.b Distribución

Warner & Finamore fueron los primeros en describir la presencia de compuestos del tipo Np_nN (Gp_4G y Gp_3G) en quistes de *Artemia* (Finamore & Warner, 1963; Warner & Finamore 1965a) a concentraciones del orden mM.

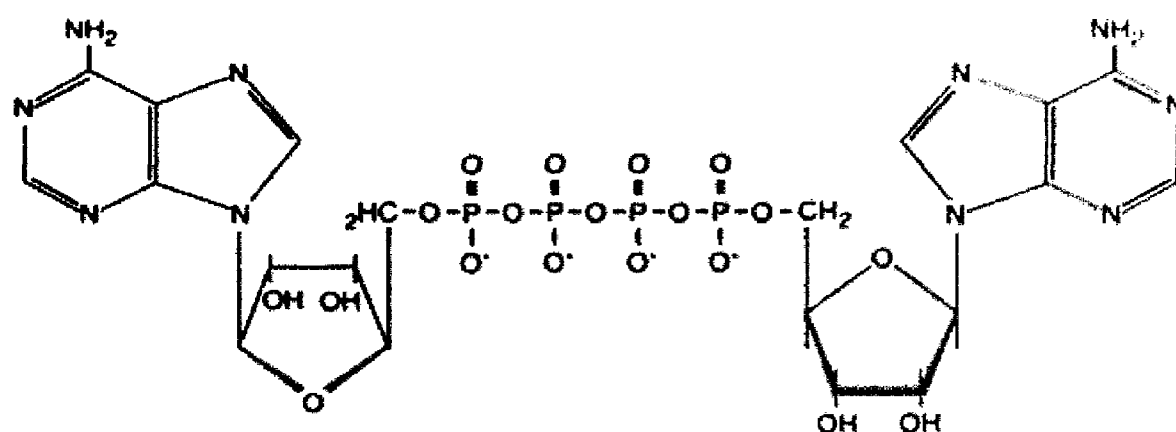


Figura 1. Fórmula desarrollada de diadenosina tetrafosfato (Ap_4A)

El grupo de Zamecnik observó la presencia de este dinucleótido en hígado de rata a una concentración de 30 nM (Zamecnik & Stephenson 1969). Posteriormente éste y otros dinucleótidos han sido descritos en diversos órganos y tejidos animales, en distintas líneas celulares, tanto procariotas como eucariotas, etc, a concentraciones también del orden nM (Garrison & Barnes, 1992). Puede decirse que estos compuestos tienen una distribución ubicua en los seres vivos. Concentraciones más elevadas de diadenosina polifosfatos se han encontrado en plaquetas sanguíneas (Flodgaard & Klenow, 1982; Lüthje & Ogilvie, 1983; Sillero & col. 1994; Schlüter & col. 1998; Jankowski & col. 1999a,b); en gránulos cromafines (Rodríguez del Castillo & col. 1988; Sillero & col. 1994); en vesículas sinápticas de *Torpedo* (Pintor & col. 1992a) y en sinaptosomas de cerebro de rata (Pintor & col. 1992b). Recientemente se ha descrito la presencia de diadenosina difosfato (Ap₂A) en tejido muscular cardíaco humano (Luo & col. 1999).

En un principio los dinucleósido polifosfatos más estudiados fueron el Ap₄A y el Ap₃A por ser éstos los primeros encontrados en células animales. La detección posterior de Ap₅A, Ap₆A y Ap₇A (Rodríguez del Castillo & col. 1988; Pintor & col. (1992c), Jankowski & col. 1999a,b) y de Ap_nG y Gp_nG (n=3-6) (Schlüter & col. 1998) ha incrementado el interés por estos compuestos así como el número de científicos interesados en este campo.

Los polifosfatos, p₄A y p₅A, fueron inicialmente detectados como contaminantes de preparaciones comerciales de ATP (Marrian, 1954; Sacks, 1955). Más tarde se encontró p₄A en concentraciones del orden micromolar en extractos de músculo de caballo y conejo (Lieberman, 1955; Small & Cooper, 1966) y en hígado de rata (Zamecnik & Stephenson, 1969). Concentraciones 20 veces más elevadas que las determinadas en músculo e hígado se han observado durante la fase de esporulación de *S.cerevisiae* (Jakubowski, 1986). También se ha descrito la presencia de p₄A en médula suprarrenal bovina (Van Dyke & col. 1977; Sillero & col. 1994) y en plaquetas de conejo (Lee & col. 1995).

1.2. METABOLISMO DE LOS (DI) NUCLEOSIDO POLIFOSFATOS

1.2.a Degradación

Estos compuestos, aunque minoritarios si se comparan con el ATP, ADP, AMP, etc., tienen enzimas específicas que los degradan (principalmente hidrolasas), y pueden ser además degradados por enzimas inespecíficas

Los Np_nNs son sustratos inespecíficos de la fosfodiesterasas I (EC 3.1.4.1) (Jakubowski & Guranowski, 1983; Cameselle & col. 1984; Luthje & Ogilvie, 1985; Gasmi & col. 1998) y de las nucleotido pirofosfatasas (EC 3.6.1.9) (Bartkiewicz & col. 1984; Robinson & Barnes, 1986). Recientemente se han encontrado en *E. coli* otras dos proteínas (Orf 257 y Orf 186) que se pueden considerar como enzimas no específicos capaces de catabolizar Np_nNs . Este encuentro fue el resultado de buscar en *E. coli* proteínas que contuvieran el motivo MutT. La proteína Orf 257 resultó ser una NADH pirofosfatasa, capaz de hidrolizar Ap_2A , Ap_3A y Ap_4A (Frick & Bessman, 1995); y la proteína Orf 186 hidrolizaba Ap_3A , Ap_3G , Ap_2A y Ap_4A entre otros nucleótidos (O'Handley & col. 1998).

En plantas y en mamíferos hay enzimas que hidrolizan específicamente p_4Ns (Small & Cooper, 1966; Guranowski & col., 1997). Estos compuestos son además hidrolizados inespecíficamente por la exopolifosfatasa (EC 3.6.1.11) (Guranowski & Robinson, 1996; Guranowski & col. 1998) y otras hidrolasas como la fosfatasa alcalina (EC 3.1.3.1) (Fernley, 1971) y ácida (3.1.3.2) (Hollander, 1971); fosfodiesterasa I (EC 3.1.4.1) (Razzell, 1963), la apirasa, (EC 3.6.1.5) (Guranowski & col. 1991), etc.

En cuanto a enzimas específicas capaces de hidrolizar o fosforilar Np_nNs se conocen varias que se resumen a continuación.

1.2.a.1 Dinucleósido trifosfatasa (EC3.6.1.29)

La primera dinucleósido trifosfatasa específica fue descrita por Sillero & col. en 1977, desde entonces se ha encontrado esta actividad enzimática tanto

en eucariotes como en procariotes. Este enzima hidroliza específicamente Np_3Ns a $NMP + NDP$, aunque la actividad enzimática de algunas fuentes hidroliza también en menor medida dinucleósidos tetra- y pentafofosatos, generando siempre un mononucleósido monofosfato como uno de los productos de la reacción (Jakubowski & Guranowski, 1983; Hurtado & col. 1987; Guranowski & Sillero, 1992).

Recientemente se ha hecho la observación interesante de que un gen supresor de tumores en humanos (*FHIT*) (Ohta & col. 1996) codifica una dinucleósido trifosfatasa (Barnes & col. 1996).

1.2.a.2 Dinucleósido tetrafosfatasa asimétrica (EC 3.6.1.17)

Esta enzima hidroliza los Np_4N asimétricamente ($Np_4N \rightarrow NTP + NMP$) y fue descrita, por vez primera, por Warner & Finamore (1965b) en quistes de *Artemia* como una actividad que capaz de hidrolizar Gp_4G a $GMP + GTP$. En 1975 Lobatón & col. describieron una enzima con las mismas características en hígado de rata. Encuentros subsiguientes (Guranowski & Sillero 1992) habían llevado a suponer que era una actividad propia de eucariotes superiores, sin embargo, recientemente, Conyers & Bessman, 1999 y Cartwright & col. 1999, han descrito una tetrafosfatasa asimétrica en la bacteria *Bartonella bacilliformis*. Esta hidrolasa, aunque con menos eficacia es también activa sobre dinucleósido penta- o hexafofosatos (Np_5N o Np_6N), dando lugar como uno de los productos a un nucleósido trifosfato (Guranowski & Sillero 1992).

Una característica peculiar de esta enzima es su inhibición por mononucleósido tetrafofosatos (p_4A , p_4G) (Vallejo & col. 1974; Lobatón & col. 1975; Guranowski & Sillero, 1992) a concentraciones submicromolares.

La identificación de genes de esta enzima de distintas fuentes ha mostrado que estas hidrolasas presentan una secuencia de amino ácidos (GX₅EX₇REUXEEXGU) típica de la familia de proteínas MufT o (hidrolasas Nudix) (Thorne & col. 1995).

1.2.a.3. Dinucleósido tetrafosfatasa simétrica (EC 3.6.1.41)

Esta enzima capaz de hidrolizar los Np_4N a 2NDP ha sido descrita en *Physarum polycephalum* (Barnes & Culver, 1982) y en varias bacterias (Guranowski & col. 1983). Puede hidrolizar también otros Np_nN (siendo n igual o mayor de 3); uno de los productos formados es siempre un NDP (Guranowski & Sillero, 1992).

1.2.a.4. Dinucleósido tetrafosfato fosforilasa (EC 2.7.7.53)

Esta actividad fue encontrada inicialmente por Guranowski & Blanquet (1985) en *S. cerevisiae*. Estudios posteriores han confirmado la presencia de esta actividad en otras fuentes (Guranowski & Sillero, 1992; McLennan & col. 1994, 1996).

Esta enzima cataliza la fosforólisis de Ap_4A para dar lugar a $ADP + ATP$. Puede utilizar otras Np_nN como sustratos y en todos los casos se produce NDP como uno de los productos. Al ser una reacción reversible es posible a partir de ATP (o GTP) y NDP sintetizar Ap_4N (o Gp_4N) con liberación de P_i (Guranowski & Blanquet (1986).

Hay estudios que parecen indicar que esta actividad fosforilasa y la ADP sulforilasa (EC 2.7.7.5) podrían corresponder a la misma enzima (Plateau & col. 1989).

1.2.a.5. Ap_6A hidrolasas

Una novedad reciente ha sido el descubrimiento de una Ap_6A hidrolasa en *S. cerevisiae* (Cartwright & McLennan, 1999a) y en *S. pombe* (Ingram & col. 1999). Estas enzimas catalizan la hidrólisis del Ap_6A a p_4A y ADP. Este encuentro surgió como resultado de la búsqueda de proteínas con el motivo MutT en su secuencia. Sorprendentemente estas enzimas parecen corresponder a la difosfoinositol polifosfato fosfohidrolasa humana (DIPP), enzima capaz de hidrolizar tanto el Ap_6A como el Ap_5A ; por su parte las Ap_6A hidrolasas de *S. cerevisiae* y *S. pombe* hidrolizan también difosfoinositol polifosfatos (Safrany & col. 1999).

1.2.a.6. Np4N y Np3N hidrolasas y su relación con la familia de proteínas HIT o GAFH

En 1995 Huang & col. clonaron en *S. pombe* el gen *aph1* que codificaba una Ap₄A hidrolasa asimétrica. En ese gen identificaron dos bloques muy similares a los presentes en la familia de proteínas HIT. Las proteínas HIT contienen 4 histidinas conservadas, una de ellas se encuentran en el bloque 1 y las otras tres en un segundo bloque formando una triada, HxHxHxx en dónde x representa un residuo hidrofóbico (Seraphin, 1992).

En 1996 Ohta & col. observaron que la proteína humana Fhit codificada por el potencial gen supresor de tumores *FHIT*, presentaba un 52% de identidad y un 69 % de similitud con la Ap₄A hidrolasa asimétrica de *S. pombe*. Aunque en principio se creía que la proteína fhit tendría actividad Ap₄A hidrolasa, pronto se pudo demostrar que esta proteína era una dinucleósido trifosfato hidrolasa típica (Barnes & col. 1996). Posteriormente Chen & col. (1998) demostraron que la Ap₃A hidrolasa descrita en *S.cerevisiae* (Brevet & col. 1991) era el producto de un gen *APH1/hnt2* similar al gen *FHIT*. Actualmente se considera que la proteína humana fhit, la Ap₄A hidrolasa asimétrica de *S. pombe* y la Np₃N hidrolasa de *S. cerevisiae* constituyen una rama eucariótica particular de la familia de proteínas HIT (Abend & col. 1999)

Otra rama de la familia de proteínas HIT incluye las proteínas Hint (histidine triad nucleotide binding protein) a la que pertenecen probablemente nucleotidil transferasas e hidrolasas, pero de las que todavía no se conocen sus sustratos específicos (Brenner & col. 1997). Por otra parte en la Ap₄A fosforilasa (EC2.7.7.53) y en las galactosa-1-fosfato uridiltransferasas (GalT) (EC 2.7.7.12) la glutamina substituye una histidina en la tercera posición de la triada. Estas enzimas se consideran parientes lejanos de las proteínas HIT y se encuadran dentro de una superfamilia denominada GAFH a la que pertenecen nucleotidil transferasas e hidrolasas (GalT, Ap₄A fosforilasa, Fhit y Hint) (Huebner & col. 1998).

1.2.a 7. Np4N hidrolasas y las proteínas MutT o hidrolasas Nudix

Existen una serie de proteínas que contienen un motivo estructural común MutT. La secuencia del motivo MutT es GX₅EX₇REUXEEXGU, donde U representa un amino ácido hidrofóbico voluminoso, generalmente I, L o V (Koonin 1993; Bessman & col. 1996). El progenitor de esta familia fue el gen *mutT* de *E. coli* que codifica la proteína MutT, una nucleósido trifosfato pirofosfohidrolasa (Abeygunawardana & col. 1995). Esta proteína es un componente del sistema GO que previene el efecto tóxico del 7,8-dehidro-8-oxo-2'dGTP (8-oxo-dGTP), un nucleótido mutagénico que se forma por oxidación espontánea del dGTP, y se inserta frente a residuos de dA y dC durante la replicación del DNA. La inactivación del gen *mutT* aumenta específica y significativamente la frecuencia de la inversión A-T/C-G. La proteína MutT tiene una pequeña actividad dGTPasa dando lugar a dGMP + PP_i, pero su actividad sobre 8-oxo-dGTP es mucho más elevada. (Koonin, 1993). En 1996 Bessman & col. propusieron que las proteínas MutT con actividad enzimática degradarían compuestos tóxicos para la célula o bien metabolitos normales presentes en cantidades excesivas. También recomendaron la denominación de "nudix hidrolasas", según ellos menos confuso que la denominación original de proteínas MutT, porque sus sustratos se caracterizaban por estar constituidos por un nucleosido difosfato unido a un residuo, x. La secuenciación de dos Np4N hidrolasas (asimétricas) de mamíferos mostró que estas proteínas eran miembros de la familia de proteínas "Nudix". (Thorne & col. 1995; Hankin & col. 1997). De igual forma las Np4N hidrolasas (asimétrica) de la leguminosa (*Lupinus angustifolius*) (Maksel & col. 1998) y de cebada (*Hordeum vulgare*) (Churin & col. 1998) poseen el motivo MutT. El clonaje de secuencias conteniendo el motivo MutT, su expresión y la purificación de la correspondiente proteína ha permitido el encuentro de una serie de hidrolasas con actividad sobre dinucleósido polifosfatos. De ese modo Conyers & Bessman (1999) y Cartwright & col. (1999), de forma independiente, vieron que el gen *ialA* de *Bartonella bacilliformis*, codificaba una nudix hidrolasa con actividad Np4N hidrolasa (asimétrica). Otros miembros de las Nudix hidrolasas con capacidad de hidrolizar Np_nN' encontrados por este procedimiento han sido los siguientes: *E.coli* Orf 257 (YJAD) una NADH

pirofosfatasa, no descrita capaz de hidrolizar Ap₂A, Ap₃A y Ap₄A (Frick & Bessman, 1995); la proteína Orf 186 (YRFE) que hidroliza preferentemente Ap₃A pero que también hidroliza eficientemente NADH y ADP-ribosa (O'Handley & col. 1998); y las proteínas con actividad Ap₆A hidrolasa: YOR163w de *S. cerevisiae* (Cartwright & McLennan, 1999a), Aps1 de *S. pombe* (Ingram & col. 1999) y la difosfoinositol polifosfato fosfohidrolasa humana (Safrany & col., 1999). En el caso de esta última enzima el sustrato no se ajusta a la definición de "nudix".

1.2.b Síntesis de dinucleósido polifosfatos

Desde el descubrimiento, en 1966, por Zamecnik & col. de que las aminoacil tRNA sintetasas catalizaban *in vitro* la síntesis de dinucleósido polifosfatos, estas enzimas han sido consideradas las responsables de su síntesis *in vivo*. Resultados obtenidos por Brevet & col. en 1989 apoyaban esta hipótesis ya que estos autores observaron que estirpes de *E. coli* que tenían aumentadas las actividades aminoacil tRNA sintetasas unas 20 a 74 veces tenían aumentado también el contenido de dinucleósido tetrafosfatos (Ap₄N) de 3 a 14 veces.

En 1974 Warner & col. (1974a,b) purificaron parcialmente a partir de embriones de *Artemia* una enzima, la guanilil transferasa (EC 2.7.7.45), capaz de catalizar la síntesis de Gp₄G utilizando 2 moléculas de GTP como sustrato. El mecanismo de esta reacción ha sido estudiado nuevamente por el grupo de McLennan (Liu & McLennan, 1994; Cartwright & McLennan, 1999b). Esta enzima tiene su interés en *Artemia* debido a las elevadas concentraciones que se encuentran de Gp₄G y Gp₃G en quistes de *Artemia*.

En 1990 y tomando como base la síntesis de dinucleósido polifosfatos catalizada por las tRNA sintetasas, el grupo de Sillero (Guranowski & col. (1990) formuló la hipótesis de que otras enzimas (principalmente ligasas y transferasas) capaces de formar un complejo E-X-AMP (X= ácido orgánico) con liberación concomitante de PPi podrían catalizar la síntesis de dinucleósido polifosfatos mediante reacciones similares a las catalizadas por las aminoacil tRNA sintetasas.

Las reacciones normalmente consideradas para las ligasas son las siguientes:



en donde X e Y representan un ácido orgánico y un residuo alcohólico, respectivamente.

En presencia de pirofosfatasa y en ausencia (o una concentración relativamente baja) del residuo alcohólico, estas enzimas podrían catalizar la síntesis de Ap₄A u otros (di)nucleótidos dependiendo de la especificidad de la enzima para los distintos nucleótidos.



También se sugirió (Guranowski & col. 1990) que en situaciones metabólicas no ajustadas, el nivel de cosubstratos específicos como por ejemplo tRNAs (en el caso de las aminoacil tRNA sintetetasas) o CoA (para las acil-CoA sintetetasas) podría bajar, favoreciendo la síntesis de dinucleósido polifosfatos a través de las reacciones [1] y [3]. De ese modo los dinucleósido polifosfatos podrían jugar el papel de señales intracelulares indicativas de un desequilibrio metabólico, o de reguladores que intentan corregir esa situación (Sillero & Sillero, 1989).

Dentro del contexto de esta hipótesis se estudiaron una serie de enzimas con los resultados que se recogen a continuación.

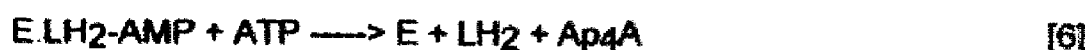
1.2.b.1. Luciferasa de luciérnaga (EC 1.13.12.7)

La luciferasa cataliza las reacciones [4] y [5] con emisión de luz (McElroy & col. 1969)



Donde LH₂ representa D(-) luciferina

La similitud entre las reacciones [1] y [4] indujo a suponer (Guranowski & col. 1990) que esta enzima podría sintetizar Ap₄A según la reacción [6], similar a la reacción [3] catalizada por las tRNA sintetetasas.



De hecho se pudo demostrar que la luciferasa de *Photinus pyralis* era capaz de sintetizar no sólo Ap₄A sino otros (di)nucleótidos con un número de fosfatos superior a cuatro (Sillero & col. 1991, Ortiz & col. 1993)

Aunque en un principio se había asumido que la síntesis de (di)nucleósido polifosfatos tenía lugar según la reacción [6] en la que el complejo E.LH₂-AMP actuaba como donador del residuo adenilo, estudios posteriores (Dukhovich & col. 1996; Fontes & col. 1997; Fontes & col. 1998a), en los que se trató de correlacionar el destino de LH₂, la emisión de luz y la síntesis de dinucleósido polifosfatos, demostraron que el complejo E.L-AMP (L = dehidroluciferina) y no el previamente asumido E.LH₂-AMP era el principal intermediario en la síntesis de Ap₄A (reacción [7]).



1.2.b.2. Acetil-CoA sintetasa (EC 6.2.1.1) y acil CoA sintetasa (EC 6.2.1.8)

Con ambas enzimas se ha podido demostrar la síntesis de (di)nucleósido polifosfatos. En el caso de la acetil CoA sintetasa de levadura se ha visto que a diferencia de las aminoacil-tRNA sintetisas y la luciferasa que requieren la presencia de un amino ácido o luciferina, respectivamente, para formar el complejo E-X-AMP, la acetil-CoA sintetasa de levadura puede transferir el residuo adenilo del ATP a un polifosfato sin tener que formar, aparentemente, un complejo E-X-AMP como intermediario de la reacción (Guranowski & col. 1994). La acil-CoA sintetasa de *Pseudomonas fragi*, que fue el enzima comercial utilizado, se comportó de modo parecido a la acetil-CoA sintetasa en lo que respecta a la síntesis de (di)nucleósidos polifosfatos al no requerir la presencia de un ácido graso. Según algunos autores el mecanismo de reacción de hidrólisis de ATP en AMP + PPi podría no depender necesariamente de la presencia de un ácido graso (Philipp & Parsons, 1979; Rose & col., 1979) lo que explicaría la falta de requerimiento de ácido graso para sintetizar (di)nucleótidos (Fontes & col. 1998b y 1999).

Puesto que las acil-CoA sintetisas de mamífero se localizan en membranas celulares se podría pensar que estas enzimas fueran responsables de la síntesis de los diadenosina polifosfatos que se encuentran

en células cromafines y en las terminales sinápticas del sistema nervioso (Sillero & Sillero, 2000).

La semejanza funcional entre las acil-CoA sintetetasas y la luciferasa había sido ya analizada por McElroy & col. (1967). Más recientemente se ha visto la semejanza estructural y funcional de varias luciferasas con otras enzimas capaces de formar acil-adenilatos. Estas enzimas se han agrupado dentro de lo que se conoce como la "superfamilia de la luciferasa" (Bairoch, A. (1999), nombre que deriva del hecho de que la secuencia primaria de la luciferasa de *Photinus pyralis* fue la primera descrita (De Wet & col., 1987).

1.2.b.3. T4 DNA ligasa (EC 6.5.1.1)

La T4 DNA ligasa cataliza la formación de un enlace fosfodiéster, entre grupos terminales 3'-hidroxilo y 5'-fosforilo vecinos, en un DNA de doble cadena (Lehman, 1974; Lindahl & Barnes, 1992). La reacción tiene lugar en tres etapas:



La primera etapa implica la transferencia y unión covalente del grupo adenilo del ATP a un grupo ε-amino de un residuo lisina del enzima con liberación de PP_i.

Pudimos demostrar, al seguir la formación del complejo E-[³²P]AMP, por electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida, que tanto el P₃ como el GTP eran capaces (en presencia de pirofosfatasa) de desplazar el AMP del complejo, con formación de p₄A y Ap₄G, respectivamente (Madrid & col. 1998). Las reacciones que tienen lugar para la síntesis de Ap₄Ns son las siguientes:



como se desprende de las ecuaciones [9] y [12] tanto el DNA-5'-P (DNA mellado) como los NTPs o P₃ pueden competir y compiten por el mismo complejo E-AMP (Madrid & col. 1998).

Estos encuentros abren perspectivas en cuanto al diseño de nuevas drogas antitumorales, particularmente algunos derivados de (tri)polifosfatos o incluso de NTPs o NDPs para poder ser utilizados como posibles inhibidores de las DNA ligasas.

1.3 PAPEL BIOLÓGICO DE LOS (DI)NUCLEOSIDO POLIFOSFATOS

Hacer un breve resumen del papel de estos compuestos no es fácil. Muchos de los resultados descritos inicialmente, en los que se les asignaba un papel como inductores de la proliferación celular, no parecían confirmarse. Sin embargo, resultados obtenidos *in vitro* utilizando dinucleótidos como efectores de determinadas actividades enzimáticas han sido ampliamente reproducidos, si bien se desconoce su posible significado *in vivo*. Por otra parte la existencia de orgánulos capaces de segregar dinucleósido polifosfatos ha estimulado la búsqueda de receptores específicos y del posible papel de los dinucleósido polifosfatos como efectores extracelulares. A continuación se indicaran de una manera resumida los encuentros más representativos.

1.3.a. Dinucleósido polifosfatos como efectores enzimáticos

La adenilato quinasa fue la primera enzima que se encontró que era fuertemente inhibida por Ap₄A (Purich & Fromm, 1972) y Ap₅A (Lienhard & Secemski, 1973). Se asumió que esta fuerte inhibición era debido a que estos compuestos actuaban como análogos del estado de transición, es decir, su estructura se asemeja, en un mecanismo de tipo secuencial, a la que presentan los dos sustratos ligados al centro activo del enzima. Posteriormente se vio que otras quinasas (adenosina quinasa, timidina quinasa, etc) eran también inhibidas por dinucleósido polifosfatos (revisado en Sillero & Cameselle, 1992). Estudios recientes (Lavie & col. 1998) utilizando rayos X, adenilato quinasas de diversas fuentes y Ap₅A o Ap₅dT, han confirmado esta hipótesis.

En 1976 Renart & col. describieron el efecto activador del Gp4G ($K_a = 30$ nM) sobre la GMP reductasa de *Artemia*. Este efecto fue posteriormente confirmado por Spector & col. (1979) utilizando enzima de eritrocitos humanos.

La aparente simetría de las vías metabólicas de los nucleótidos de purinas llevó a probar el Ap4A como posible activador de la AMP deaminasa, habiendo encontrado que este dinucleótido activaba al enzima con una $K_a = 5$ micromolar (Fernández & col. 1984). Recientemente Delaney & col. (1997) han observado que el Ap5A y el Ap6A son activadores de la AMP deaminasa de cerebro de rata.

También se ha descrito el efecto activador del Ap4A y de otros dinucleósido polifosfatos sobre la IMP-GMP 5'-nucleotidasa citosólica a concentraciones del orden micromolar (Pinto & col. 1986; Itoh & Yamada (1990); Marques & col. 1998).

1.3.b Dinucleósido polifosfatos como "alarmonas"

Estudios llevados a cabo por el grupo de Ames (Lee & col. 1983a, 1983b, Bochner & col. 1984) indicaban que en situaciones de estrés aumentaba la concentración intracelular de dinucleósido polifosfatos, de ahí que surgiera la hipótesis de que estos compuestos podrían actuar como segundos mensajeros (alarmonas) induciendo la síntesis de las proteínas *hsp* (heat shock protein). Sin embargo evidencias aportadas por otros grupos (Miller & McLennan, 1986; Plateau & col. 1987) e incluso por el propio grupo de Ames (Farr & col. 1989), indican que un aumento en la concentración intracelular de Ap4A no induce síntesis de *hsp*.

1.3.c Dinucleósido polifosfatos y diferenciación celular

A partir de la hipótesis formulada en 1976 por Rapaport y Zamecnik según la cual la concentración intracelular de Ap4A podría regular la velocidad de multiplicación celular, surgieron numerosas publicaciones tanto confirmando como negando esta hipótesis. La conclusión final fue que la disparidad de resultados podía ser debida a los bajos niveles de estos compuestos y en la dificultad técnica para cuantificarlos (Garrison & Barnes, 1992; Remy, 1992). Sin

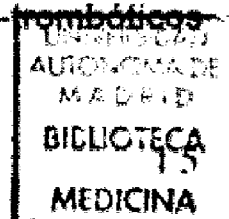
embargo, recientemente, hay trabajos que apuntan de nuevo a la posibilidad de que los dinucleósido polifosfatos podrían estimular la multiplicación celular, actuando no a nivel intracelular sino a través de receptores de la superficie celular (Heidenreich & col. 1995; Schulze-Lohoff & col. 1995; Schluter & col. 1998). El grupo de Nishimura ha demostrado en estirpes salvajes de *E. coli*, que niveles elevados de Ap₄A adelantan la división celular mientras que niveles bajos la retrasan (Nishimura & col., 1997; Nishimura, 1998). Según otros autores Vartanian & col. 1996, 1997; Kisselev & col. 1998) lo que cuenta no son tanto los niveles elevados de Ap₄A sino la relación Ap₃A/Ap₄A y que esta relación es un indicador más sensible del estado celular.

1.3.d Interacción con receptores celulares

La naturaleza de los receptores que median los efectos causados por los diadenosina polifosfatos no está clara. Varios grupos han intentado clasificar los receptor(es) de polifosfatos de diadenosina dentro de los conocidos subtipos del receptor purinérgico P₂ (Hoyle, 1990; Pintor & col. 1991; Bo & col. 1994), mientras que otros encuentros apuntan a la existencia de receptores específicos para Ap₄A. El grupo de Hilderman ha descrito un receptor específico para Ap₄A en tejidos de ratón (Hilderman & col. 1991; Walker & col. 1993; Hilderman & col. 1994), y Pintor & col. (1993, 1995) encuentran en vesículas sinápticas de rata dos receptores (P_{2d} y P₄) que ligan polifosfatos de diadenosina y que tienen características propias. Sin embargo Edgecombe & col. (1996) no han podido demostrar, en células de hígado de rata, una subpoblación de lugares de unión específicos para Ap₄A ya que encuentran una estrecha correlación entre los sitios de unión reconocidos por el Ap₄A y los reconocidos por el ATP.

1.3.e Funciones extracelulares de los dinucleósido polifosfatos

Los objetivos mejor caracterizados para los dinucleósido polifosfatos extracelulares lo constituyen las células del sistema vascular. El Ap₄A es un inhibidor de la agregación plaquetaria (Chao & Zamecnik, 1984) lo que ha llevado a investigar la posibilidad de usar como agentes anti-trombóticos.



análogos sintéticos del Ap₄A. (Zamecnik & col. 1992) Más recientemente se ha confirmado el efecto inhibitor del Ap₅A, Ap₆A y Ap₇A, que también se encuentran en las plaquetas (Jankowski & col. 1999). El Ap₄A y sus homólogos, Ap₃A, Ap₅A y Ap₆A modulan el tono vascular y por ello podrían estar implicados en el control de la presión arterial (Schlüter & col. 1994, 1996. Kikuta & col. 1994, 1999).

Los diadenosina polifosfatos inducen también alteraciones en el metabolismo celular del hígado. Busshardt & col. (1989) observaron que tanto el Ap₃A como el Ap₄A estimulaban, en hígado perfundido de rata, la salida de glucosa más eficazmente que el ATP. Posteriormente, se demostró, utilizando células de hígado aisladas, que estos polifosfatos estimulaban la actividad glucógeno fosforilasa (Craig & col. 1993). Estos efectos están relacionados con la habilidad de los diadenosina polifosfatos de influir en la concentración del Ca²⁺ citosólico libre en las células de hígado de rata (Keppens, 1996).

OBJETIVOS

Cuando se inició este trabajo se sabía, por resultados de este laboratorio, que la T4 DNA ligasa era capaz de catalizar la síntesis *in vitro* de dinucleósido polifosfatos, pero faltaban por determinar algunas características de la reacción. En consecuencia se plantearon los siguientes objetivos:

1. Completar la caracterización de la reacción de síntesis de dinucleósido polifosfatos catalizada por la T4 DNA ligasa.
2. Analizar la posibilidad de que otras ligasas (T4 RNA ligasa, Pfu DNA ligasa, etc) catalizaran también la síntesis de (di)nucleósidos polifosfatos y en caso afirmativo estudiar las características de las reacciones respectivas.

3.1 MATERIALES

3.1.a Aparatos

Las medidas de absorbancia se realizaron en un espectrofotómetro Shimadzu modelo UV-160A y en un lector de Elisa modelo EL 340 de Bio-Tek.

Las cromatografías de alta resolución (HPLC) se realizaron en un cromatógrafo líquido de Hewlett Packard (HP) modelo 1090 con detector de diodos en circuito integrado acoplado a un ordenador. Las columnas utilizadas en HPLC fueron Hypersil ODS (2,1 x 100 mm ó 4,6 x 100 mm) de HP, y MonoQ HR 5/5 (50 x 5 mm) de Pharmacia.

La cuantificación de la radioactividad de las placas cromatográficas con [^{32}P] se realizó en un Instantimager (Packard Instrument Co). Para el revelado de las autorradiografías se utilizó un revelador Agfa modelo Curix 60.

Las fuentes y cubetas empleadas para la realización de electroforesis fueron de BioRad.

Para las centrifugaciones se emplearon centrífugas Beckman J2-21 y Heraeus Biofuge 13; y el rotor JA-17 de Beckman.

El liofilizador utilizado fue de Virtis modelo Freezenmobile 6.

3.1.b Productos

La RNA ligasa del bacteriófago T4 se compró a Boehringer Mannheim (Ref. 1449478; lotes 84064023-08, 84064024-08, 84064027, 85014020, 85014021). Una unidad (U) es la actividad enzimática que cataliza la transformación de 1 nmol de 5- ^{32}P -rA₁₂₋₁₈, en una forma resistente a fosfatasa, en 30 min a 37°C.

La fosfatasa alcalina (grado I) (Nº Cat. 108138), fosfodiesterasa de *Crotalus durissus* (Nº Cat. 108260), pirofosfatasa inorgánica de levadura (Nº Cat. 108987) y ATP γ S se obtuvieron de Boehringer Mannheim.

Luciferasa de luciérnaga (*Photinus pyralis*) (Nº Cat. L-5256), Ap_nA (n=2 a 5), Gp₃G y Gp₅G fueron de Sigma. Gp₂G y Gp₄G se purificaron de *Artemia* (Vallejo & col. 1974). Xp₄X se preparó por deaminación de Gp₄G, igual a como está descrito para la deaminación del Gp₃G, y purificado por cromatografía de intercambio iónico (Sillero & col. 1977). Ap₄G se sintetizó con luciferasa de

luciérnaga (Ortiz & col. 1993).

Poli(A) (Ref.9403), tripolifosfato sódico(P_3) (Ref 5633), tetrapolifosfato hexaamónico (P_4) (Ref. 5758) y polifosfato sódico Tipo 15 (P_{15}) (Ref. 6003) fueron de Sigma. La pureza de los polifosfatos fue confirmada por cromatografía de intercambio iónico, como se describe en (Marques & col. 1998). Mientras que P_3 y P_4 tenían una pureza mayor del 97% y 90%, respectivamente; P_{15} era una mezcla de al menos 20 polifosfatos diferentes (Marques & col. 1998).

pd(A)₁₂₋₁₈ fue de Pharmacia Biotech (Ref. 27-7975), pCp de Pharmacia (Ref. 27-1505), CpG de ICN Biomedicals GmbH (Ref. 104854), y GpC de Sigma (Ref. G-1506).

El [α -³²P]ATP fue de Dupont Nen (Nº Cat. 003H02128), con una actividad específica de 3000 Ci/mmol. Los residuos radiactivos generados en los ensayos fueron apropiadamente evacuados por el Servicio de Radioprotección de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid.

Las placas de aluminio de gel de sílice fluorescente (TLC 60 F₂₅₄) fueron de Merck; el dioxano y amoníaco utilizados para la elución de las placas, de Panreac. Las películas empleadas para autorradiografías fueron de Kónica Corporation (Japón).

Las membranas utilizadas para la ultrafiltración de la pirofosfatasa inorgánica tenían un límite de exclusión de 30 kDa y eran de Vivascience (Ref. VS0121).

Para los geles se utilizó acrilamida-bisacrilamida (Nº Cat. 1.10784 y 10897 respectivamente) de Merck. Los patrones de peso molecular eran de BioRad (NºCat.161-0304).

Para la determinación de proteínas se utilizó el reactivo Bio-Rad Protein assay (Nº Cat. 500-0006) de Bio-Rad.

3.2 MÉTODOS

3.2.a Síntesis de (di)nucleósido-polifosfatos

3.2.a.1 Utilizando T4 RNA ligasa

Las preparaciones comerciales de T4 RNA ligasa de Boehringer contienen 10.000 U/ml. Al no venir indicada la proteína, esta se determinó utilizando el método de Bradford (1976). Todas las preparaciones analizadas por electroforesis

en gel de poliacrilamida en presencia de SDS, mostraron la presencia de una única banda con un peso molecular de 42 kDa. Según esto la actividad específica de las distintas preparaciones utilizadas era alrededor de 1800 U/mg. El tampón utilizado para diluir esta enzima fue el siguiente: 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM DTT, 0.5 mg/ml BSA.

Para sintetizar (di)nucleósido-polifosfatos mediante esta enzima se utilizaron esencialmente 2 métodos de ensayo:

Método A: Este método utilizaba [α - 32 P]ATP y los productos de reacción se analizaban por cromatografía de capa fina (TLC). La mezcla de reacción contenía en un volumen final de 0,02 ml: 50mM Tris-HCl (pH 7.4), 1mM ditioneol (DTT), 5 mM $MgCl_2$, 0,02 mM ATP, 0,1 μ Ci [α - 32 P] ATP, 1U/ml de pirofosfatasa desalada (sin sulfato amónico), T4 RNA ligasa y el correspondiente nucleótido (GTP,ATP,dATP,ADP...) o tripolifosfato (P_3) como aceptores, a las concentraciones que se indiquen. La mezcla de reacción se incubaba a 30°C y a distintos tiempos se tomaban alícuotas de 2 μ l que se aplicaban en una placa de gel de sílice, junto con los patrones adecuados. (Ver 3.2.b.1).

Método B: En este caso los productos de reacción se analizaban por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Las condiciones de ensayo eran esencialmente las mismas que las del método A, pero utilizando concentraciones más elevadas de ATP (no radiactivo). El curso de la reacción se seguía tomando alícuotas de 0,01 ml que se añadían sobre 0,14 ml de agua destilada, se hervían durante 1,5 min y se analizaban por HPLC, como se describe en 3.2.b.2.

3.2.b Análisis y cuantificación de (di)nucleótidos

3.2.b.1 Por cromatografía en capa fina (TLC)

Alícuotas de la mezcla de reacción (normalmente 2 μ l) se aplican en una placa de gel de sílice y se eluye con una mezcla de dioxano:amoníaco:agua en la proporción (V/V) de 6:1:6 o de 6:1:4, según se indique. Cuando el experimento lo requiera, se aplicaban simultáneamente patrones de compuestos no radiactivos.

Las manchas correspondientes a los distintos nucleótidos se localizan iluminando con una lámpara de luz ultravioleta a la longitud de onda de 253 nm;

los compuestos radiactivos [^{32}P] se analizan en un Instantlmager y por autorradiografía.

3.2.b.2 Por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Las muestras a analizar se hierven durante 1.5 min para así desnaturalizar la proteína presente, después se enfrían, se centrifugan durante 1 min a 13.000 rpm, se filtran a través de membranas de nitrocelulosa (Millipore HA, 0,45 μm) y alícuotas de 0,05 ml se inyectan en una columna de Hypersil ODS. La elución se realiza a flujo constante de 0,5 ml/min, utilizando durante los primeros 20 minutos un gradiente lineal de 5 a 30 mM de fosfato sódico (pH 7,5) en 20 mM de tetrabutilamonio y 20% de metanol (Tampón A), y durante los 10 minutos siguientes un gradiente lineal de 30 a 100 mM de fosfato sódico (pH 7,5) en tampón A. En el caso particular de la Fig. 34e, la columna fue adicionalmente eluida durante 30 min, con 100 mM de fosfato sódico en tampón A.

Los perfiles cromatográficos se registraron generalmente a una longitud de onda de 260 nm. La identificación de los mono y dinucleótidos sintetizados se hizo por los espectros de absorción (en las Figs. 12 y 13e, se muestran los espectros de algunos dinucleótidos), por el tiempo de retención y por los productos formados al tratar con fosfatasa alcalina y/o fosfodiesterasa.

Para la cuantificación de los resultados se comparó el área de los picos con las curvas de calibración obtenidas con concentraciones conocidas del producto a cuantificar.

3.2.c T4 RNA ligasa

3.2.c.1 Formación del complejo T4 RNA ligasa-AMP. Análisis por electroforesis en gel

La mezcla de reacción contenía en un volumen final de 0,02 ml: 50 mM Tris-HCl (pH 7,4), 1mM DTT, 5mM MgCl_2 , 5 μM ATP, 0,1 μCi [α - ^{32}P] ATP, 0,02 U de pirofosfatasa desalada y, cuando se indique tripolifosfato (P_3). Se incubó la mezcla durante 15 minutos, para eliminar el posible pirofosfato contaminante de la preparación comercial de P_3 . La formación del complejo E-AMP se inició al añadir 2U de T4 RNA ligasa. Después de 15 min de incubación, se pararon las reacciones con 6,5 μl de tampón de muestra concentrado (0,25 M Tris-HCl (pH

6,8), 8% SDS, 40% glicerol, 240 mM DTT, 0,005% azul de bromotlenol). Las mezclas se calentaron a 90°C durante 3 min y se aplicaron alicuotas de 6 µl en un gel de poliacrilamida al 12% en condiciones desnaturalizantes (Laemmli, 1970). Tras someter el gel a una electroforesis de 30 mA durante 1 hora, se tiñó con azul de Coomassie (Fairbanks & col. 1971), se secó y el complejo enzima-AMP se visualizó por autorradiografía. En las mismas condiciones se corrieron patrones de peso molecular comprendido entre 97,4 y 14,4 kDa.

3.2.c.2 Síntesis de Gp₄GpCp y pCpGp₄GpCp

A no ser que se especifique de otra manera, las mezclas de reacción contenían en un volumen final de 0,03-0,05 ml: 50 mM Tris-HCl (pH 7,4), 1mM DTT, 5mM MgCl₂, 0,02 mg/ml BSA, 1U/ml de pirofosfatasa desalada, T4 RNA ligasa, ATP, pCp y Gp₄G. Las mezclas de reacción se incubaron a 30°C y a distintos tiempos se tomaron alicuotas de 0,01 ml a las que se les añadió 0,14 ml de agua destilada y se procesaron y analizaron por HPLC como se describe en 3.2.b.2.

3.2.c.3 Purificación y caracterización de Gp₄GpCp

La mezcla de reacción contenía en un volumen final de 0,3 ml: 0,5 mM ATP, 0,5 mM pCp, 0,6 mM Gp₄G, 50 U de T4 RNA ligasa y los otros componentes como se indica en 3.2.c.2. La mezcla de reacción se incubó a 30°C durante 22 horas, después se calentó a 95°C durante 2 min, se diluyó 3 veces con agua destilada y alicuotas de 0,05 ml se aplicaron en una columna MonoQ (5x50 mm) equilibrada en 0,5 M de NH₄HCO₃ (pH 8,0). Tras aplicar la muestra, se lavó la columna a una velocidad de flujo de 1 ml/min durante 3 min con el mismo tampón; los compuestos que quedaron retenidos fueron eluidos con un gradiente de 0,5 a 1 M de NH₄HCO₃ durante 15 min. Las fracciones de interés se recogieron y se concentraron por liofilización.

a) Tratamiento con fosfatasa alcalina y fosfodiesterasa: A una mezcla de reacción de 0,21 ml que contenía 0,057 A₂₆₀ de Gp₄GpCp, 25 mM Tris-HCl (pH 7,5) y 1mM MgCl₂, se añadieron 1,5 U de fosfatasa alcalina (FA) y se incubó durante 30 min a 37°C. Seguidamente se calentó a 100°C durante 5 min para inactivar la fosfatasa, se apartó una alicuota de 0,1 ml, y a la mezcla residual se

añadieron 2 µg de fosfodiesterasa de veneno de serpiente (FDE), incubando a 37°C durante 30 min. En las Figs. 25b y 25c se recoge el resultado después de tratar con FA y FA + FDE, respectivamente.

b) Tratamiento con fosfodiesterasa y fosfatasa alcalina. Una mezcla de reacción de 0,21 ml, que contenía Gp₄GpCp igual que en a), se incubó en presencia de 1 µg de FDE durante 30 min a 37°C. Seguidamente se inactivó la FDE por calentamiento a 100°C durante 5 min, se apartó una alícuota de 0,1 ml y a la mezcla residual se añadieron 1,5 U de fosfatasa alcalina y se incubó a 37°C durante 30 min. En las Figs. 25d y 25e se recoge el resultado de ambos tratamientos.

c) Tratamiento con KOH: Una mezcla de reacción de 0,067 ml que contenía 0,018 A₂₆₀ de Gp₄GpCp y 0,3 N KOH se incubó a 37°C durante 18 horas. Transcurrido este tiempo se neutralizó con ácido perclórico. Tras enfriar y centrifugar, se recuperó el sobrenadante que se diluyó hasta 0,2 ml. Se apartó una alícuota de 0,1 ml y al resto se añadió MgCl₂ 1 mM y 1,5 U de fosfatasa alcalina, se incubó a 37°C durante 1 hora.

3.2.d Otros métodos

3.2.d.1 Síntesis de Xp₄X

La dixantosina tetrafosfato (Xp₄X) se obtuvo por deaminación de la diguanosina tetrafosfato (Gp₄G).

Se disolvieron 9 mg de Gp₄G en 1,5 ml de HCl 2N, y se añadió lentamente y con agitación 0,5 ml de NaNO₂ 4N. Tras permanecer la mezcla a temperatura ambiente durante 30 minutos, se aplicó a una columna (24x0,85 cm) de Sephadex G-10, previamente equilibrada con agua destilada. Se recogieron fracciones de 1 ml. Las fracciones 15-22, en las que eluía un pico con absorción al ultravioleta, se reunieron y liofilizaron. El liofilizado se resuspendió en 0,25 ml de agua destilada y se recromatografió en una columna MonoQ (5x50) equilibrada en 0,16M NH₄HCO₃ (pH 8,0). La elución se hizo a un flujo de 1 ml/min, con un gradiente de 0,16 M a 1 M de NH₄H CO₃ en 30 minutos. Las fracciones que contenían el Xp₄X se reunieron y concentraron por liofilización. El Xp₄X se caracterizó por el

espectro de absorción ultravioleta (λ_{max} a 260 y a 280 nm a pH 8, el cociente $A_{280}/A_{260} = 1,08$) y el tiempo de retención.

3.2.d.2 Síntesis de Ap_4G

La síntesis de Ap_4G para utilizarlo como patrón y como sustrato (Fig. 34c), se llevó a cabo con luciferasa de luciérnaga según Ortiz & col. (1993).

La mezcla de reacción en un volumen final de 0,3 ml contenía: 5 mM $MgCl_2$, 0,1 mM luciferina, 2 mM $ATP\gamma S$, 2 mM GTP, 0,1% BSA, 0,6 U de pirofosfatasa desalada y 0,83 mg/ml de luciferasa. La mezcla de reacción se incubó a 30°C durante 24 horas; después se trató con 15 U de FA a 37°C, durante 2 h. Aliquotas convenientemente diluidas se aplicaron a una columna MonoQ (5x50) en las mismas condiciones que se describen en 3.2.d.1. Las fracciones que contenían Ap_4G se reunieron y concentraron por liofilización.

3.2.d.3 Eliminación del sulfato amónico de la pirofosfatasa comercial

La pirofosfatasa inorgánica se utiliza para hidrolizar el PPI producido durante los ensayos enzimáticos, o también para eliminar el posible PPI contaminante del P_3 .

La pirofosfatasa inorgánica (EC 3.6.1.1) comercial de la casa Boehringer es una suspensión del enzima en una solución de sulfato amónico 3,2 M. Como el sulfato amónico resultó ser un inhibidor de la síntesis de dinucleósido-polifosfatos catalizada por la T4 DNA y T4 RNA ligasa, la pirofosfatasa fue sistemáticamente desalada por ultrafiltración antes de su uso.

Para eliminar por ultrafiltración el sulfato amónico se procede como sigue: una alícuota de 0,125 ml de la pirofosfatasa comercial diluida 4 veces con agua destilada, se introduce en un microconcentrador con una membrana de exclusión molecular de 30 kDa y se centrifuga a 14000xg durante 20 min descartando el filtrado. Al filtro se le añaden 0,45 ml de agua destilada, después de una nueva centrifugación se desecha el filtrado, y se recupera el material retenido en el filtro. A este se le añade el agua necesaria para que se obtenga un volumen final, igual al de la enzima de partida (0,125 ml). Se reparte en alícuotas que se guardan a -20°C.

3.2.d.4 Análisis por electroforesis en gel de distintas preparaciones comerciales de T4 RNA ligasa

Para saber el grado de pureza de las preparaciones comerciales de T4 RNA ligasa de Boehringer Mannheim, estas se analizaron por electroforesis en gel

A 1 µl de enzima (10 U de RNA ligasa de Boehringer) se le añaden 26 µl de tampón de muestra (1M Tris-HCl (pH 6.8), 32% SDS, 160% glicerol, 0,96 M DTT, 0.02% azul de bromofenol). Se hirvieron las mezclas a 90°C durante 3 min, y se aplicaron alícuotas de 10 µl en un gel de poliacrilamida al 12% en condiciones desnaturizantes (Laemmli 1970) que se corrió a 30 mA durante 1 hora. La tinción se realizó con azul de Coomassie (Fairbanks & col.1971). En las mismas condiciones se corrieron patrones de peso molecular comprendido entre 97,4 y 14,4 kDa.

3.2.d.5 Determinación de proteínas

La cuantificación de proteínas se realizó según el método descrito por Bradford (1976), utilizando albúmina de suero bovino (BSA) como proteína patrón. Estos ensayos se realizaron siempre por duplicado y como mínimo con dos cantidades diferentes de muestra a analizar.

4. RESULTADOS

4.1 SINTESIS DE (DI)NUCLEOSIDO POLIFOSFATOS CATALIZADA POR LA T4 RNA LIGASA

Este trabajo tenía por objeto, como ya se mencionó en la Introducción, buscar actividades enzimáticas capaces de catalizar la síntesis de (di)nucleósidos polifosfatos.

Uno de los primeros enzimas ensayados fue la T4 DNA ligasa. Los resultados obtenidos, en los que colaboré en parte, se recogen al final como trabajo publicado (Madrid y col. 1998).

En cuanto se observó que la T4 DNA ligasa era capaz de sintetizar dinucleósido polifosfatos investigamos esta posibilidad utilizando T4 RNA ligasa.

El mecanismo de las RNA ligasas similar al de las T4 DNA ligasas (Harnett & col. 1985), y consta de las tres etapas reversibles siguientes:



En la primera etapa tiene lugar la adenilación del enzima con liberación de PPi. En la segunda etapa el AMP del complejo E-AMP es cedido al extremo 5'-fosfato del RNA dando lugar a la adenilación de una molécula de RNA, y en la tercera etapa mediante un ataque nucleofílico del extremo 3'-OH de un RNA se forma un enlace 5'-3 entre dos moléculas de RNA y se libera AMP. A la primera molécula de RNA (5'-p-RNA) se le conoce en la literatura como *RNA dador* y a la segunda como *RNA aceptor* (OH-3'-RNA). Dependiendo de que los RNAs *dador* y *aceptor* pertenezcan o no a la misma molécula la reacción será intra o intermolecular. En el primer caso la ligasa cataliza la circularización del RNA. Esta enzima, a diferencia de la T4 DNA ligasa, puede utilizar como substratos tanto RNA como DNA (Cranston & col. 1974; Uhlenbeck & Gumpert (1982); Brennan & col. 1983; Romaniuk & Uhlenbeck 1983; Tessier & col. 1986).

4.1.a Formación del complejo E-AMP y su desplazamiento por P_3

La formación del complejo E-AMP se observó cuando la T4 RNA ligasa se incubó con $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP en ausencia de RNA, en las condiciones que se describen en Métodos 3.2.c.1. El complejo formado migró en la posición correspondiente a un peso molecular de alrededor de 45kDa (Uhlenbeck & Gumport 1982) (Fig. 2a). Cuando en estas condiciones experimentales (ausencia de PPi por la presencia de pirofosfatasa), la mezcla de reacción se suplementó con cantidades crecientes de tripolifosfato, se observó como la cantidad de complejo formado disminuía a medida que aumentaba la concentración de P_3 (Fig. 2b).

4.1.b Síntesis de Ap_4A catalizada por T4 RNA ligasa

4.1.b.1 Linealidad con el tiempo e influencia de la pirofosfatasa

El destino del AMP procedente del complejo E-AMP se estudió incubando el enzima con 0,02 mM $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP, en ausencia o presencia de pirofosfatasa (PPasa). Los productos formados se analizaron por cromatografía en capa fina (TLC) (Fig. 3a,b). La radiactividad bajo la mancha correspondiente a ATP se desplazaba dando lugar a un nuevo compuesto radiactivo que migraba en la posición de un patrón de Ap_4A . En estas condiciones experimentales la reacción era lineal durante 10 min (Fig. 3c). La velocidad de síntesis del presunto Ap_4A disminuía con el tiempo de incubación, principalmente debido a la baja concentración de ATP presente en la mezcla de reacción. La formación de este compuesto, supuesto Ap_4A , era estimulada por la presencia de pirofosfatasa (Fig. 3a,b). Las velocidades iniciales de síntesis de Ap_4A en ausencia o presencia de PPasa fueron de 0,4 y 1,2 nmol.min⁻¹.mg⁻¹ de proteína, respectivamente. Para la constante de equilibrio de la reacción $2\text{ATP} \rightleftharpoons Ap_4A + \text{PPi}$, en ausencia de PPasa, se obtuvo un valor de 0,005.

4.1.b.2 Caracterización del Ap_4A formado

La síntesis y caracterización de Ap_4A por T4 RNA ligasa se llevó a cabo utilizando mezclas de reacción (0,05 ml) que contenían 2 mM ATP, 10 U de ligasa, y el resto de componentes que se describen Métodos 3.2.a.1 (método

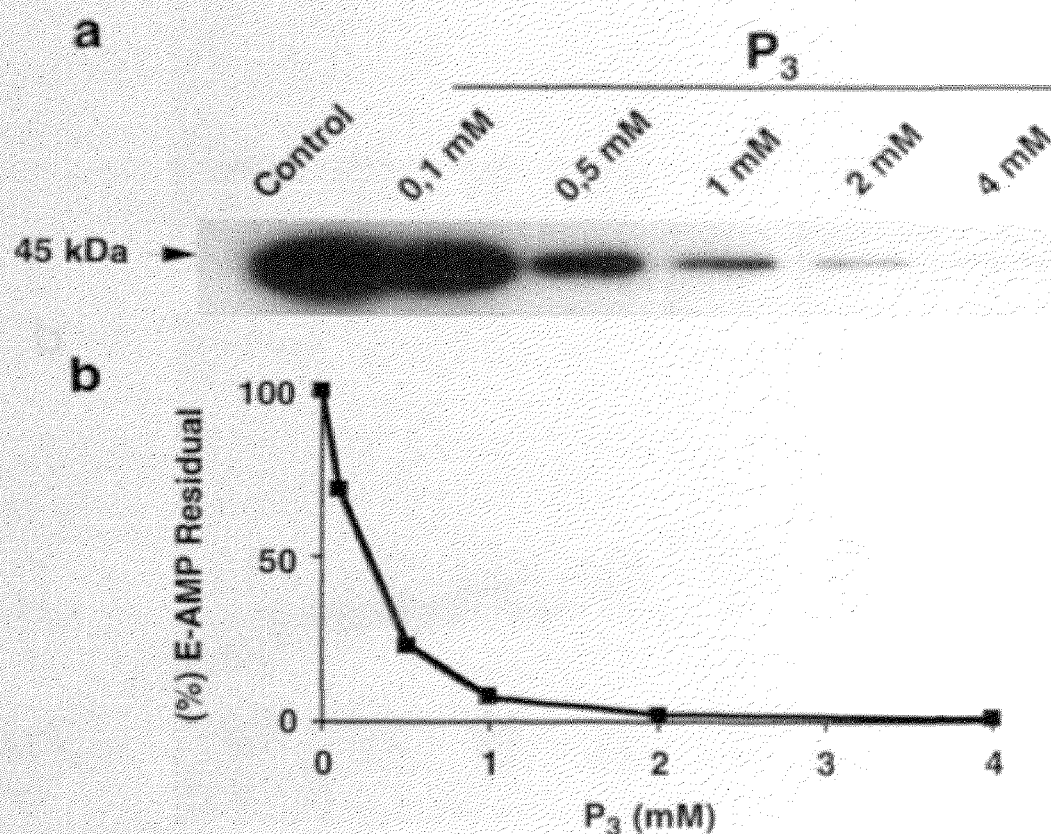


Figura 2. Inhibición de la formación del complejo T4 RNA ligasa-AMP por tripolifosfato (P_3)

La mezcla de reacción contenía 50mM Tris-HCl (pH 7,4), 1mM DTT, 5mM $MgCl_2$, 5 μ M ATP, 0,1 μ Cl [α - ^{32}P] ATP, 1 U/ml de PPasa, 100 U/ml T4 RNA ligasa y la cantidad indicada de P_3 . Después de 15 min de incubación el complejo formado se analizó por electroforesis en un gel de poliacrilamida (12%) en condiciones desnaturizantes. **a.** Porción relevante de la autorradiografía del gel. La flecha indica la posición en que migra el patrón de ovoalbúmina (45 kDa). Inhibición de la formación del complejo E-AMP por P_3 .

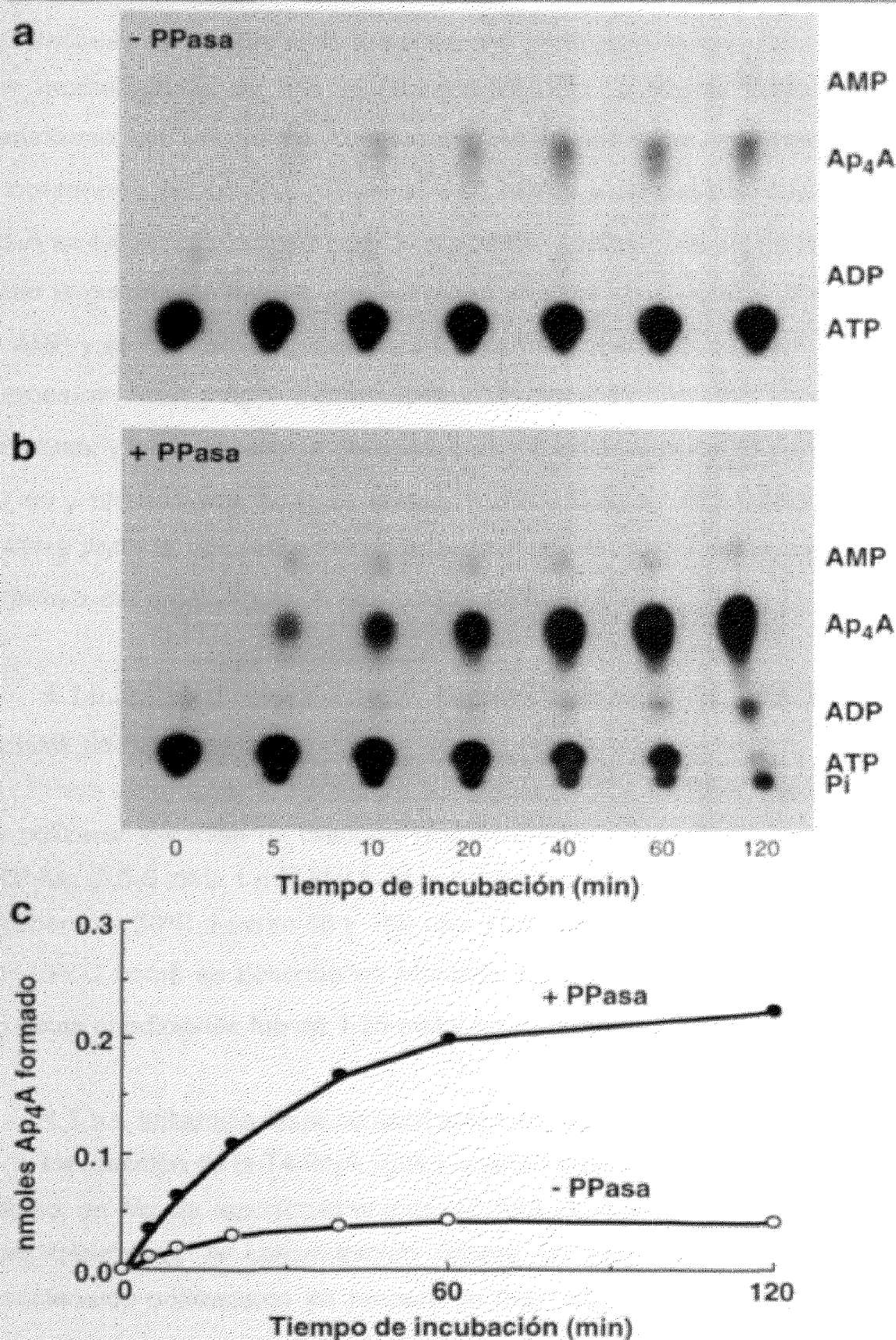


Figura 3. Síntesis de Ap₄A catalizada por T4 RNA ligasa: linealidad con el tiempo e influencia de la pirofosfatasa

Las mezclas de reacción contenían 0,02mM [α -³²P] ATP, ausencia (a) o presencia (b) de PPasa (1 U/ml), 2mM MgCl₂ y 330 U/ml T4 RNA ligasa. Se incubaron a 30°C y a los tiempos indicados se tomaron alícuotas que se analizaron por TLC. (c) Cuantificación de los resultados obtenidos en (a y b).

B). Después de incubar toda la noche, los productos de reacción se analizaron por cromatografía de alta resolución (HPLC). La mayor parte del ATP se transformó en un nuevo compuesto, Ap_4A . También se observaron picos minoritarios que correspondían a AMP, ADP y a un posible Ap_3A (Fig. 4a). El Ap_4A se caracterizó como tal por lo siguiente: coeluyó con un patrón de Ap_4A , al tratar la mezcla de ensayo con fosfatasa alcalina (1 μ g durante 2 horas a 37°C) el AMP y el ADP se degradaron a adenosina mientras que los picos de los supuestos Ap_4A y Ap_3A permanecieron inalterados (Fig. 4b). Tras inactivar la fosfatasa, y tratar la mezcla de ensayo con fosfodiesterasa (0,4 μ g) durante 10, 30, 60 y 120 min (Fig. 4c-f), se obtuvo, como resultado de la hidrólisis del Ap_4A , a ATP y AMP; la formación de un pequeño pico de ADP fue consecuencia de la hidrólisis del presunto Ap_3A por la fosfodiesterasa.

4.1.b.3 Determinación de la constante de afinidad para el ATP en la síntesis de Ap_4A

Para determinar la constante de afinidad de la T4 RNA ligasa para el ATP se utilizaron mezclas de reacción que contenían concentraciones variables de ATP-Mg (0,5-6 mM); 1 mM $MgCl_2$ libre y 200 U/ml de enzima. Las reacciones se incubaron a 30°C durante 90 y 180 min y los productos formados se analizaron por HPLC como se describe en Métodos 3.2.a.1. El valor de K_m que se obtuvo en estas condiciones fue de 1,25 mM y un valor de k_{cat} 0,055 s^{-1} .

4.1.b.4 Influencia de la concentración de Mg^{2+}

La reacción de la T4 RNA ligasa cuando cataliza la unión de RNA tiene un óptimo de Mg de aproximadamente 10 mM (Romaniuk & Uhlenbeck, (1983)). Para determinar la concentración óptima de este catión en la síntesis de dinucleósido-polifosfatos se prepararon mezclas que contenían 1 mM ATP-Mg, concentraciones variables de Mg^{2+} libre (0,5-8 mM) y 200 U/ml de enzima. Se incubó a 30°C durante 90 y 180 min y el resultado se analizó por HPLC. Según se observa en la Fig. 5 se alcanza un óptimo de síntesis de Ap_4A en presencia de 1-4 mM Mg^{2+} libre.

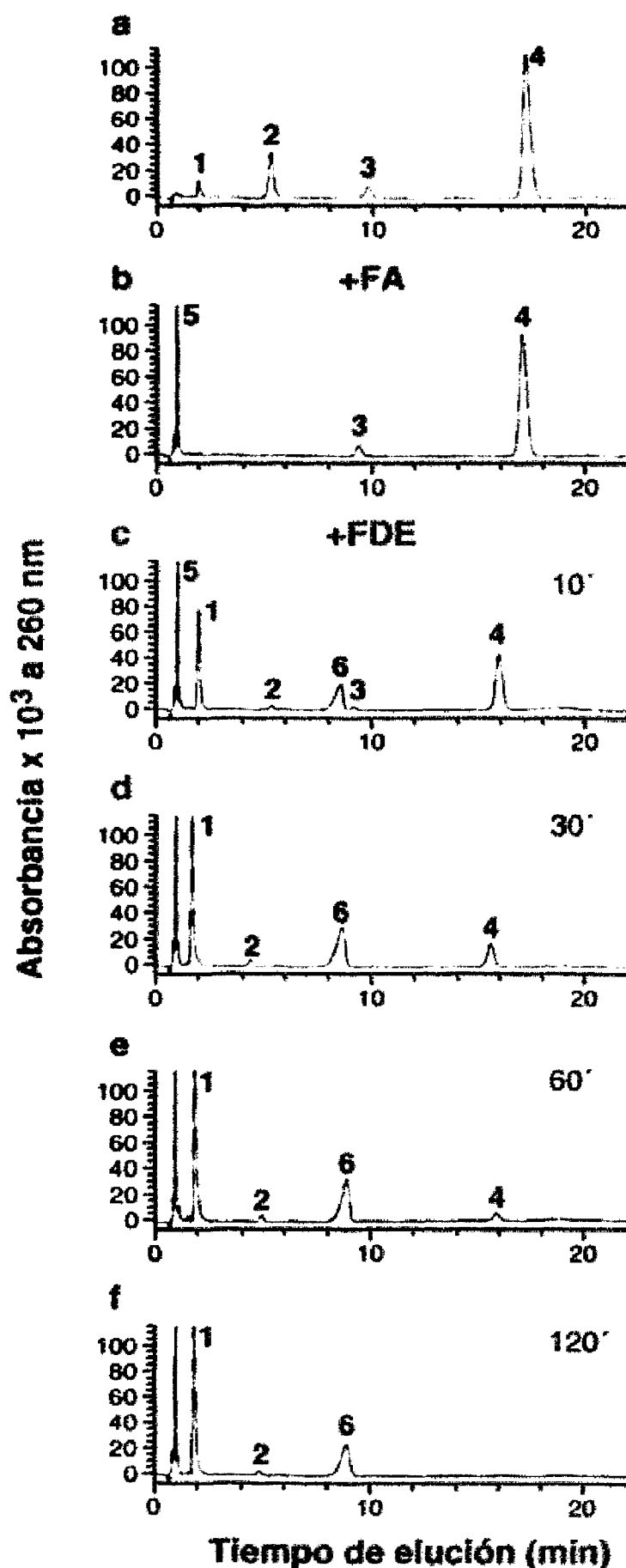


Figura 4. Síntesis de Ap_4A por T4 RNA ligasa y caracterización

La mezcla de reacción (0,05 ml) contenía 200 U/ml de T4 RNA ligasa, 2 mM ATP y el resto de los componentes indicados en Métodos; tras incubar durante 16 horas se analizó una alícuota (0,01 ml) por HPLC utilizando una columna de Hypersil ODS de 2,1 \times 100 mm (ver Métodos 3.2.b.2). En el panel a se pueden observar los picos correspondientes a AMP, ADP y a los supuestos Ap_3A y Ap_4A . Seguidamente una alícuota de la mezcla de reacción (0,04 ml) se trató con 1 μ g de fosfatasa alcalina durante 2 h y se analizó por HPLC (panel b); los picos de AMP y ADP se transformaron en adenosina, mientras que los supuestos Ap_3A y Ap_4A permanecieron inalterados. La mezcla restante (0,03 ml) se trató con fosfodiesterasa de veneno de serpiente (0,4 μ g) durante 10 min (c), 30 min (d), 60 min (e) y 120 min (f). Los números sobre los picos corresponden a los siguientes compuestos: (1) AMP; (2) ADP; (3) Ap_3A ; (4) Ap_4A ; (5) Ado; (6) ATP.

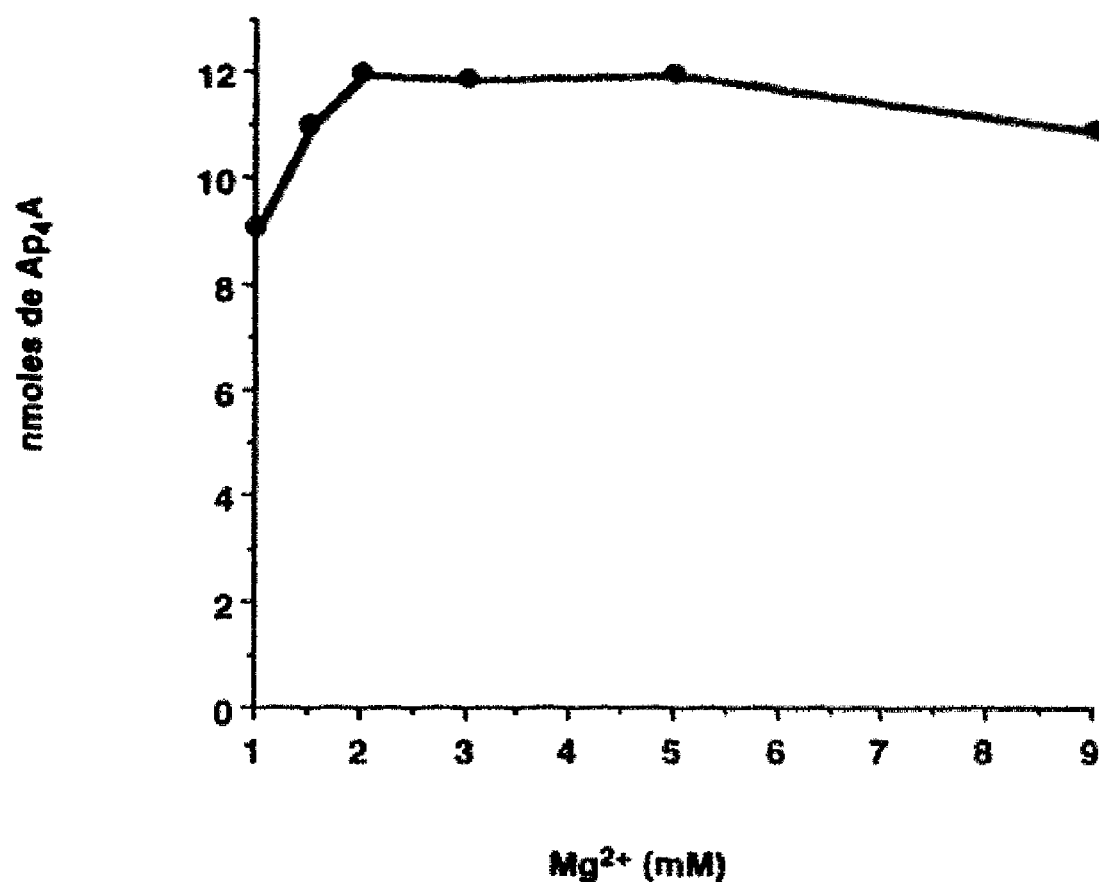


Figura 5. Síntesis de Ap_4A catalizada por T4 RNA ligasa. Dependencia de la concentración de Mg^{2+}

Las mezclas de ensayo contenían 1 mM de ATP, concentraciones variables de MgCl_2 (1-9 mM), 200 U/ml de enzima y los demás componentes que se indican en Métodos 3.2.a.1. Los productos de reacción se analizaron por HPLC. En la figura se representa el Ap_4A sintetizado a los 90 min de incubación.

4.1.c Síntesis de Ap_4G catalizada por la T4 RNA ligasa

Como se ha visto anteriormente, en presencia de pirrofosfatasa, el AMP del complejo E-AMP puede ser cedido al ATP y sintetizar Ap_4A . De igual forma a como ocurría con la T4 DNA ligasa (Madrid y col. 1998) el AMP del complejo puede reaccionar con nucleósido trifosfatos distintos de ATP y formar los correspondientes Ap_4Ns .

4.1.c.1 Determinación de la constante de afinidad para el GTP en la síntesis de Ap_4G

Los experimentos que se muestran en las Figs. 3 y 4 indicaron que el ATP se comporta no sólo como donador de AMP para la formación del complejo E-AMP sino que también se comporta como aceptor de AMP para la formación de Ap_4A . El valor de K_m para el ATP para la formación del complejo E-AMP es alrededor de $10\mu M$ (Cranston & col. 1974). Según nuestra experiencia con otras enzimas que sintetizan Ap_4A (Guranowski & col. 1994; Fontes & col. 1998b; Ortiz & col. 1993, Madrid y col. 1998) cualquier nucleósido trifosfato (NTP) puede ser aceptor de AMP, actuando con un valor de K_m alto. Por estas razones, se ensayó el GTP como aceptor de AMP, utilizando ATP marcado radiactivamente como donador de AMP. El valor de K_m para el GTP en la síntesis de Ap_4G se determinó en presencia de una cantidad fija de ATP (0.02 mM) y $0.1\mu Ci$ $[\alpha\text{-}^{32}P]$ ATP, y concentraciones variables de GTP de 0.1 a 4 mM . En estas condiciones se determinó para el GTP un valor de K_m de alrededor de 1.2 mM , y una velocidad de síntesis (k_{cat}) de 0.017 s^{-1} .

4.1.c.2 pH óptimo

El efecto del pH sobre la velocidad de síntesis de Ap_4G se determinó utilizando mezclas de reacción (0.02 ml) que contenían 0.02 mM $[\alpha\text{-}^{32}P]$ ATP ($0.1\mu C$), 4 mM GTP, 0.8 U de T4 RNA ligasa y 50 mM de cada uno de los siguientes tampones: Mes/KOH (con valores de pH de 5.5; 6.0; 6.4 y 6.7); Hepes/KOH (con valores de pH de 6.7; 7.2 y 7.6) y Tris/HCl (con valores de pH de 7.4 y 8). Se tomaron alícuotas después de 15 y 30 min de incubación a $30^\circ C$.

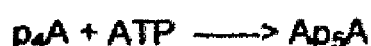
que se analizaron por TLC. El pH óptimo de la reacción fue de 7.4 (Fig.6) A pH 8.0 la actividad enzimática era alrededor del 70% de la máxima

4.1.c.3 Influencia de la concentración de Mg^{2+}

Para determinar la concentración óptima de Mg^{2+} en la síntesis de Ap_4G se prepararon mezclas (0.02 ml) que contenían 0.02 mM [α - ^{32}P] ATP (0.1 μ C), 1 mM GTP, 0.8 U de T4 RNA ligasa y concentraciones variables de Mg^{2+} (0-8 mM). Se tomaron alícuotas después de 15 y 30 min de incubación a 30°C que se analizaron por TLC. En estas condiciones de ensayo la velocidad máxima de síntesis de Ap_4G se alcanzó cuando la concentración de Mg^{2+} libre era alrededor de 5 mM. (Fig.7).

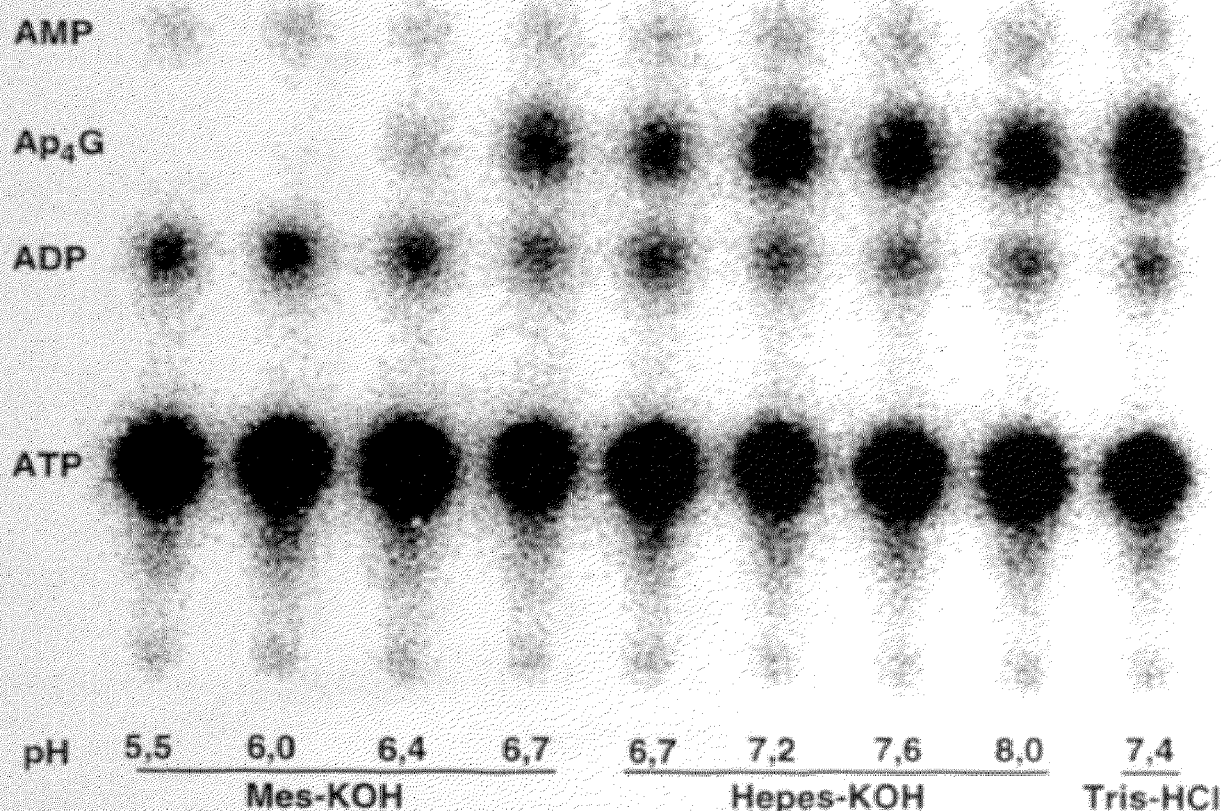
4.1.d Polifosfatos como substratos de la T4 RNA ligasa. Síntesis de p_4A y p_5A

Los polifosfatos (P_3 y P_4) se comportan, igual que el GTP, como aceptores del AMP del complejo E-AMP y sintetizan, en presencia de enzima y ATP, los correspondientes p_4A y p_5A . En la Fig. 8 se recoge el resultado de incubar 1 mM ATP en ausencia o presencia de 3 mM (P_3 , o P_4 , o el polifosfato P_{15}). En ausencia de polifosfato se observó transformación de ATP en Ap_4A (Fig. 8A,a). En presencia de ATP + P_3 , tuvo lugar la síntesis de p_4A , Ap_4A y una pequeña cantidad de Ap_5A (Fig. 8A,b), lo que reflejaba el conjunto de las siguientes reacciones:



Al utilizar P_4 como cofactor, se obtuvo Ap_4A y en menor cantidad p_5A (Fig. 8A,c). La preparación comercial de P_{15} (que consiste en una mezcla de polifosfatos (Marques y col. 1998) se comportó como inhibidor de la reacción ya que en su presencia no hubo síntesis apreciable de Ap_4A (Fig. 8A,d). Para caracterizar el p_4A sintetizado se procedió como se indica en la parte B de la

A



B

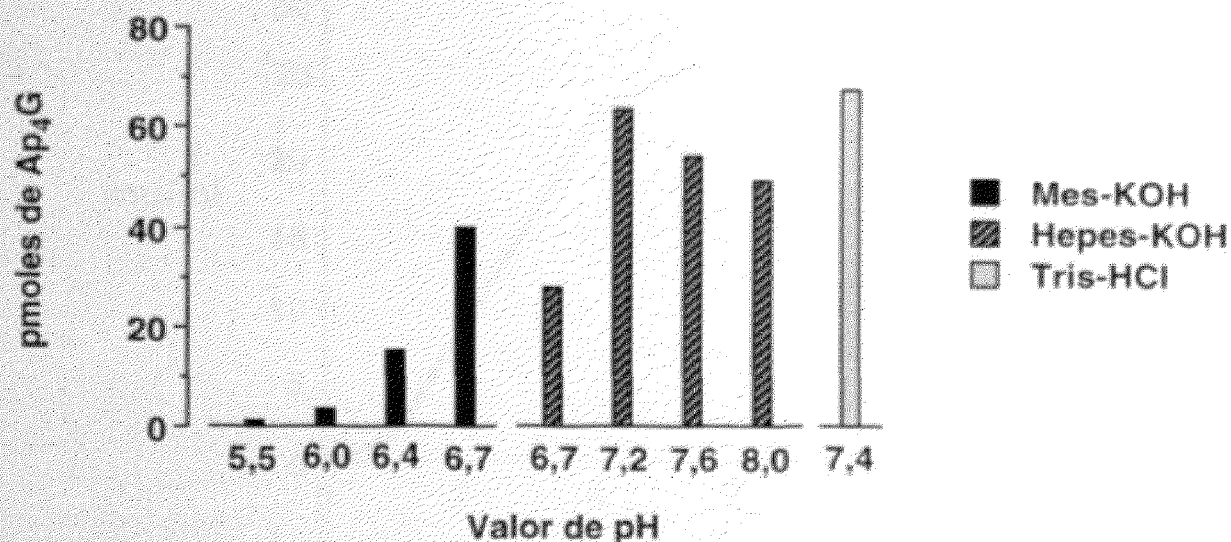
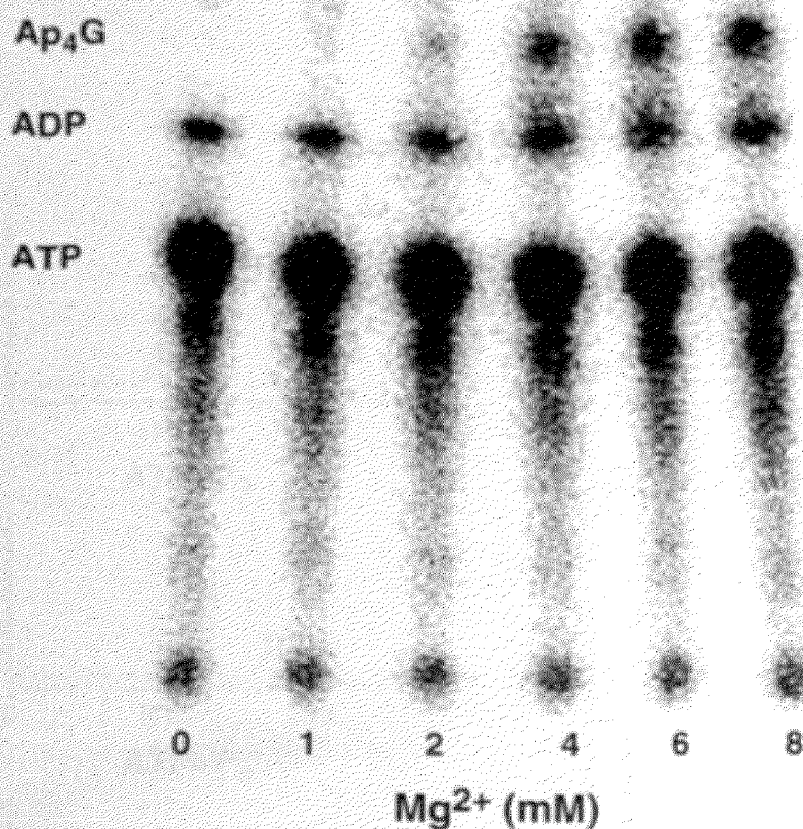


Figura 6. Efecto del valor del pH en la síntesis de Ap₄G catalizada por T4 RNA ligasa

A. Las mezclas de reacción contenían 0,02 mM [α -³²P] ATP (0,1 μ Ci), 4 mM GTP, 1 U/ml PPasa, 40 U/ml T4 RNA ligasa y 50 mM de cada uno de los tampones indicados. Análisis por TLC de los productos formados a los 30 min de incubación.

B. Cuantificación del Ap₄G sintetizado a los 15 min de incubación.

A



B

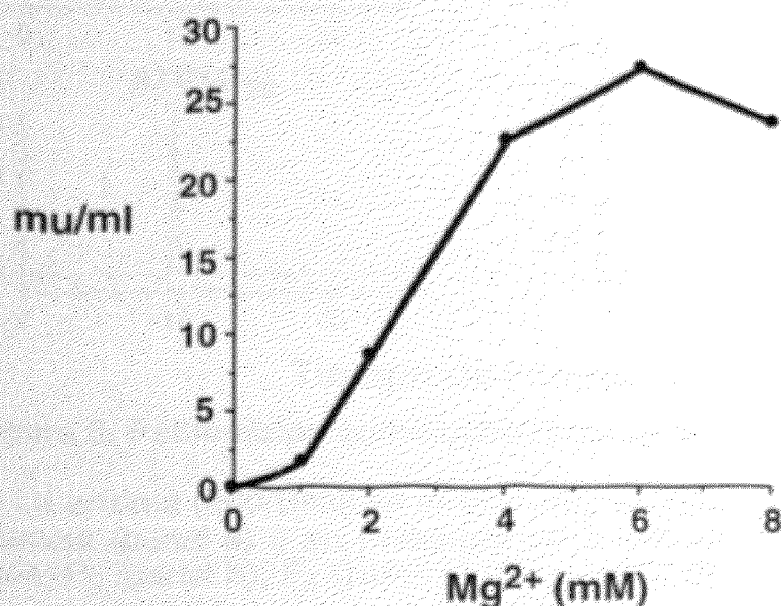


Figura 7. Óptimo de Mg²⁺ en la síntesis de Ap₄G catalizada por T4 RNA ligasa

A. Las mezclas de reacción contenían 0,02 mM [α -³²P] ATP (0,1 μ Ci), 1 mM GTP, 40 U/ml de T4 RNA ligasa y concentraciones variables de Mg²⁺ (0-8 mM). Análisis por TLC de los productos formados a los 30 min de incubación.

B. Cuantificación de la actividad de síntesis de Ap₄G en función de la concentración de MgCl₂.

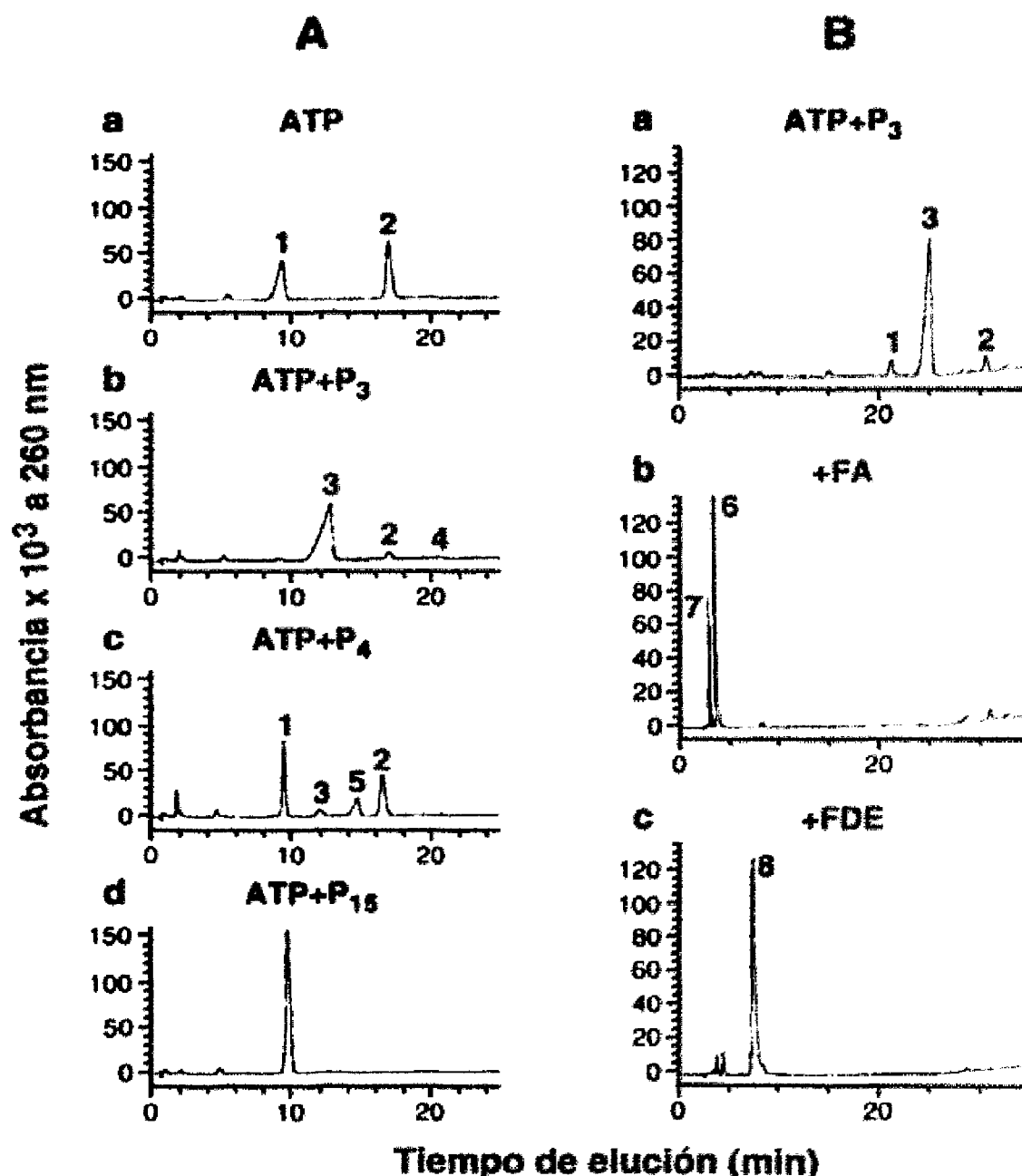


Figura 8. Polifosfatos como sustratos de la T4 RNA ligasa

A. La enzima (200 U/ml) se incubó en presencia de 1 mM ATP, pirofosfatasa y en ausencia (panel a) o en presencia de 3 mM de cada uno de los siguientes polifosfatos: P₃ (panel b), P₄ (panel c) o P₁₅ (panel d). Las mezclas de reacción se incubaron durante 14 h a temperatura ambiente, después se analizaron por HPLC en una columna Hypersil ODS de 2,1 x 100 mm.

B. Panel a: perfil de la mezcla de reacción incubada en presencia de P₃. Panel b: alícuota de esta mezcla de reacción tratada con fosfatasa alcalina (5 µg, 2h, 37°C). Panel c: alícuota de esta mezcla de reacción tratada con fosfodiesterasa de veneno de serpiente (1 µg, 2h, 37°C). Las 3 muestras se analizaron por HPLC utilizando una columna Hypersil ODS de 4,6 x 100 mm. Los números sobre los picos corresponden a los siguientes compuestos: (1) ATP; (2) Ap₄A; (3) p₄A; (4) Ap₅A; (5) p₅A; (6) adenosina; (7) inosina; (8) AMP.

Fig.8 Utilizando alícuotas de la mezcla de ensayo en la que se había incubado $\text{ATP} + \text{P}_3$ y se había obtenido el presunto p_4A (Fig. 8B,a) se pudo comprobar que: (a) el presunto p_4A coelúa con un patrón de p_4A , (b) en presencia de fosfatasa alcalina se degradaba a adenosina (e inosina, como resultado de la adenosina deaminasa que contamina la preparación comercial de fosfatasa alcalina) (Fig. 8B,b); y (c) al tratar con fosfodiesterasa de veneno de serpiente se hidrolizaba a AMP (Fig. 8B,c).

4.1.e Especificidad de sustrato

La especificidad de sustrato de la reacción de síntesis de dinucleósido polifosfatos catalizada por la T4 RNA ligasa se estudió como sigue.

4.1.e.1 Nucleótidos capaces de formar el complejo E-NMP (NMP = nucleósido 5'-monofosfato).

Este problema se abordó indirectamente estudiando la capacidad de formar distintos p_4N incubando enzima en presencia de 3 mM P_3 y 0,5 mM de distintos NTPs. En estas condiciones las velocidades relativas de síntesis del correspondiente p_4N que se obtuvieron fueron las siguientes: ATP (100), dATP (6), CTP=GTP (<1). Estos resultados están de acuerdo con resultados previos que indican que el ATP es el sustrato preferente para la reacción de ligación de RNA (Cranston & col. 1974).

4.1.e.2 Nucleósido trifosfatos como aceptores de AMP del complejo E-AMP

El valor de K_m descrito para el ATP en la reacción de adenilación del enzima es de 12 μM (Cranston & col. 1974) mientras que el valor de K_m para el ATP como aceptor de AMP resultó ser de 1,25 mM para la síntesis de Ap_4A (ver 4.1.b.3), por ello pareció conveniente abordar la síntesis de Ap_4N en presencia de baja concentración, 0,02 mM, de $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP (suficiente para formar el complejo E-AMP, pero baja para sintetizar Ap_4A) y 4 mM de nucleótido aceptor. En las Figs.9 y 10 se recoge el resultado de incubar en esas condiciones los

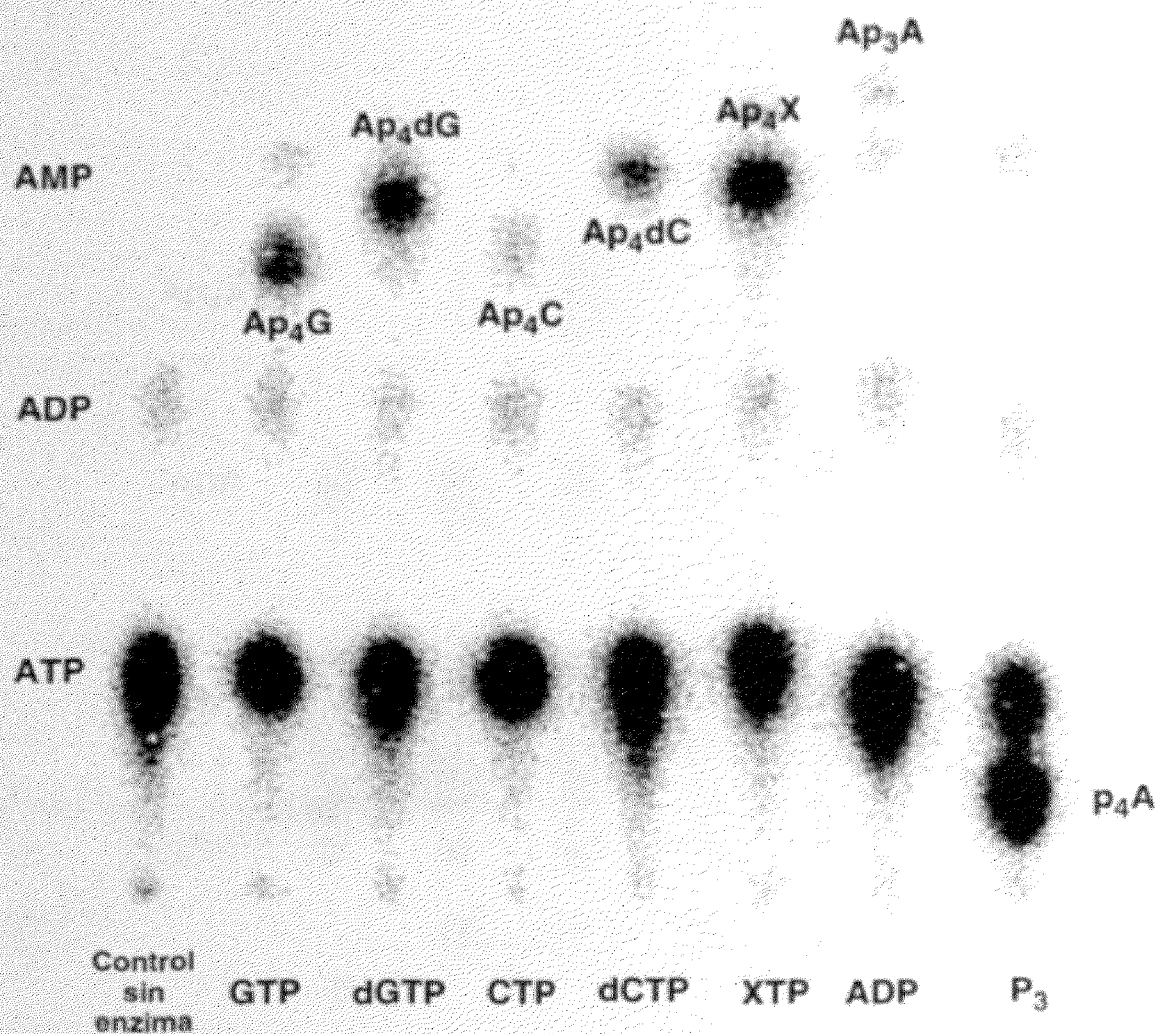


Figura 9. Síntesis de Ap₄Ns y p₄A por T4 RNA ligasa

Las mezclas de reacción contenían 40 U/ml T4 RNA ligasa, 0,02 mM [α -³²P] ATP, 4 mM (de los NTP indicados, ADP o P₃) y el resto de las condiciones que se indican en Métodos. Tras 15 min de incubación la mezcla se analizó por TLC.

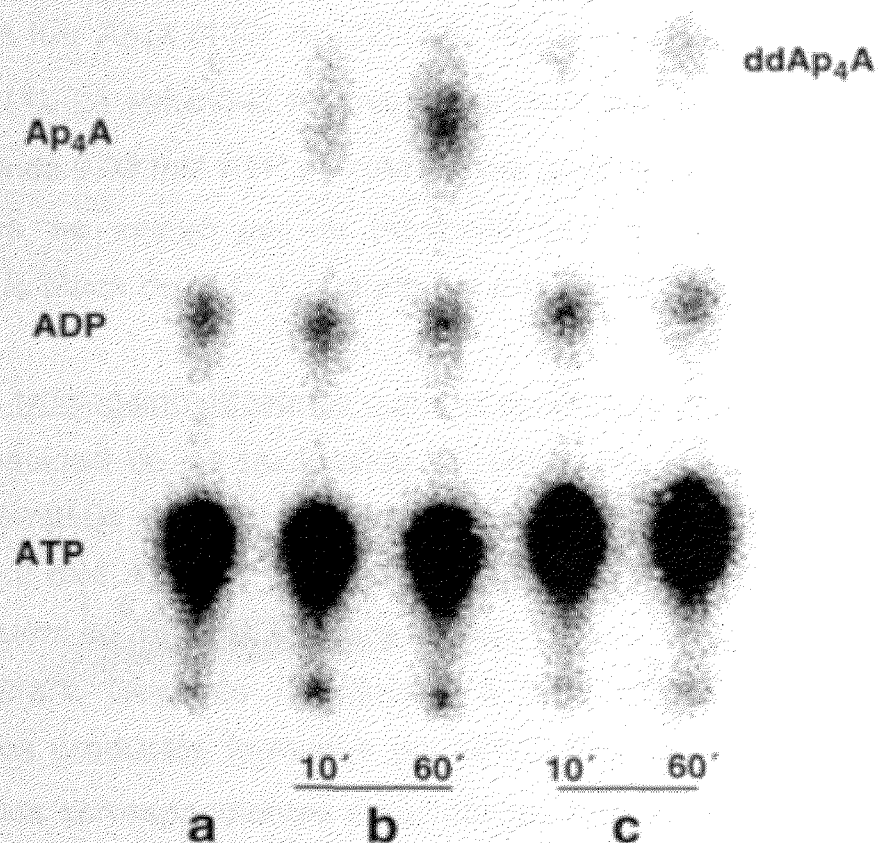


Figura 10. Síntesis de $ddAp_4A$ con T4 RNA ligasa

Las mezclas de ensayo contenían 40 U/ml de T4 RNA ligasa, 0,02 mM [α - ^{32}P] ATP, y ausencia (**b**) o presencia (**c**) de 4 mM $ddATP$. Se tomaron alícuotas de las mezclas de ensayo a los 10 y 60 min de incubación, que se analizaron por TLC. Control sin enzima (**a**).

siguientes nucleótidos: XTP, dGTP, GTP, dCTP, CTP, ADP o ddATP. Después de 15 min de incubación, separar por TLC los productos formados y cuantificar los resultados, la velocidad relativa de síntesis de los correspondientes dinucleótidos fue: Ap_4X (100); Ap_4dG (74); Ap_4G (49), Ap_4dC (23), Ap_4C (9), Ap_4A (5), Ap_4ddA (1). La velocidad relativa de síntesis de p_4A , estudiada en paralelo en presencia de 0,02 mM ATP y 4 mM P_3 , fue igual a 200. La identidad de estos dinucleótidos se evaluó por su insensibilidad a fosfatasa alcalina, por su posición en la placa de TLC y, cuando fue posible, por su espectro UV.

4.1.e.3 Nucleósido difosfatos como aceptores de AMP del complejo E-AMP

La capacidad de los nucleósido difosfatos de actuar como aceptores del AMP del complejo E-AMP se ensayó utilizando mezclas de ensayo que contenían 0,2 mM ATP-Mg, 1 mM NDP (ADP, GDP, CDP, UDP o XDP), 3 mM $MgCl_2$, 300 U/ml de T4 RNA ligasa y el resto de los componentes indicados en Métodos 3.2.a.1. Después de incubar a 30°C durante 1, 2 y 4 horas se analizaron los productos formados por HPLC (Fig. 11). La velocidad relativa de síntesis de los correspondientes dinucleótidos fue: Ap_3X (100); Ap_3U (25), Ap_3C (19); Ap_3A (18) y Ap_3G (11). La identificación de los Ap_3N formados se basó en el tiempo de retención y en los correspondientes espectros de absorción (Fig.12).

4.1.e.4 $ATP_{\gamma}S$ como sustrato de la T4 RNA ligasa

Debido a sus características moleculares, el $ATP_{\gamma}S$ ha sido muy utilizado como sustrato de la luciferasa de luciérnaga para la síntesis específica de Ap_4Ns (Ortiz & col. 1993); el $ATP_{\gamma}S$ es un buen donador del residuo adenílico para la formación del complejo E-LH₂-AMP, sin embargo es un mal aceptor del AMP para poder sintetizar Ap_4A . Debido a esto, la incubación de $ATP_{\gamma}S$, NTP y luciferasa, en presencia de LH₂ permitió la síntesis selectiva de Ap_4N .

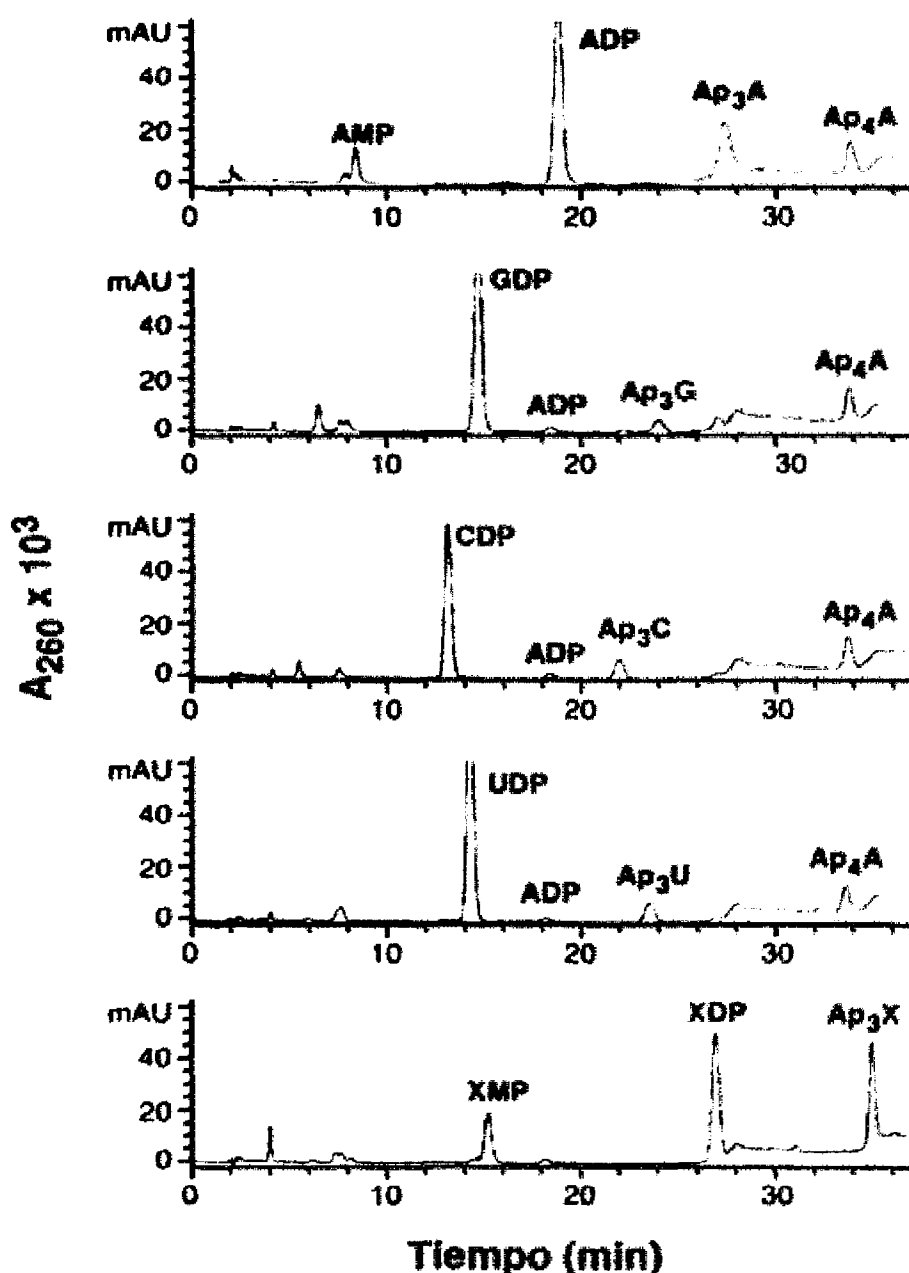


Figura 11. Síntesis de Ap₃Ns catalizada por T4 RNA ligasa

Las mezclas de ensayo contenían 50 mM Tris-HCl pH 7,4; 1 mM DTT; 3 mM MgCl₂; 1 U/ml PPasa desalada; 0,2 mM ATP-MgCl₂; 1 mM NDPs (ADP, GDP, CDP, UDP, XDP) y 156 U/ml T4 RNA ligasa. Se incubaron las mezclas a 30°C y los productos de reacción se analizaron por HPLC utilizando una columna de Hypersil ODS (4,6 x 100 mm). Se muestran los cromatogramas de alícuotas tomadas a las 4 horas de incubación.

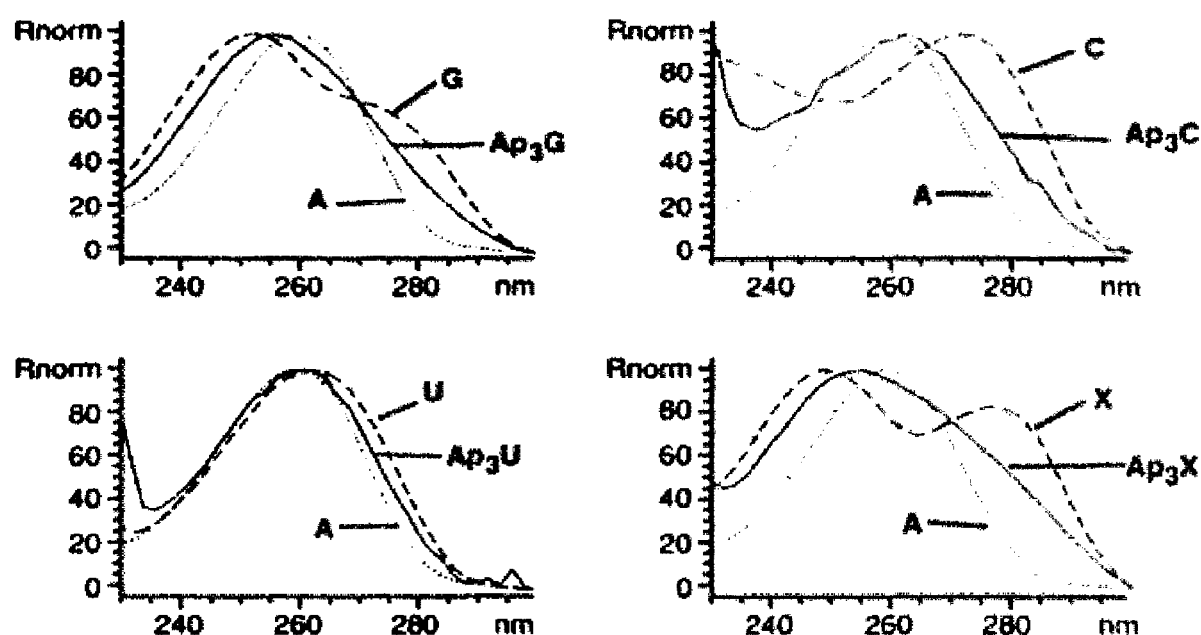


Figura 12. Espectros de absorción de Ap₃Ns

Se muestran los espectros de absorción de los diferentes Ap₃Ns sintetizados a partir de ATP, el correspondiente NDP y T4 RNA ligasa como se indica al pie de la Fig. 11. Los espectros se obtuvieron en presencia del tampón de elución de la columna y se normalizaron a una absorbancia máxima relativa del 100% (Rnorm=100).

4.1 e 4.1.1 Síntesis de Ap_4N en presencia de $ATP\gamma S$

Para comprobar si el $ATP\gamma S$ se comportaba con la enzima T4 RNA ligasa como con la luciferasa, se prepararon tres mezclas de ensayo que contenían (a) 2 mM ATP, (b) $ATP\gamma S$ + XTP (2 mM de cada) y (c) ATP + XTP (2 mM de cada) (Fig. 13). En el primer caso (considerado como control) se observó la conversión completa de ATP en Ap_4A , así como una pequeña cantidad de Ap_3A (Fig. 13a). En presencia de ATP y XTP, se observó la síntesis de Ap_4A , Ap_4X y una pequeña cantidad de Ap_3X (Fig. 13c); estos eran los resultados esperados ya que una vez formado el complejo E-AMP, el residuo adenílico se podía transferir tanto al ATP formando Ap_4A , o a XTP con formación de Ap_4X . La mezcla de ensayo que contenía $ATP\gamma S$ y XTP solo sintetizó, contrariamente a lo esperado, una pequeña cantidad de Ap_4X (Fig. 13b). Este último resultado reflejó dos hechos: (a) XTP no era capaz de formar un posible complejo E-XMP, ya que en ese caso sería de esperar que se hubiera sintetizado Xp_4X ; (b) $ATP\gamma S$ no era un buen donador del residuo adenílico para la formación del complejo E-AMP a diferencia de lo que ocurría con la luciferasa.

Como ya se vio en el apartado 4.1.b.1 la síntesis de dinucleósido polifosfatos es estimulada por la presencia de pirofosfatasa que elimina el pirofosfato generado cuando se forma el complejo E-AMP y no compete de ese modo con los NTP en la reacción en reverso. En este contexto hay que señalar que la pirofosfatasa puede hidrolizar el tiopirofosfato inorgánico (generado del $ATP\gamma S$) a P_i + tioposfato (Webb & col. 1980), evitando de esta forma su reacción con el complejo E-AMP.

La naturaleza de los productos sintetizados se analizó de varias formas: (a) por su posición cromatográfica: en nuestras condiciones experimentales, los derivados de xantina se retardan con respecto a los derivados de adenina de estructura equivalente e igual número de fosfatos; (b) al tratar con fosfatasa alcalina la mezcla de ensayo que contenía ATP y XTP, solo quedaron los picos correspondientes a Ap_4X , Ap_4A y a Ap_3X (Fig. 13d); y (c) por el espectro de absorción UV del Ap_4A (o Ap_3A) en comparación con el de Ap_4X (o Ap_3X) y con el del XTP (Fig. 13e).

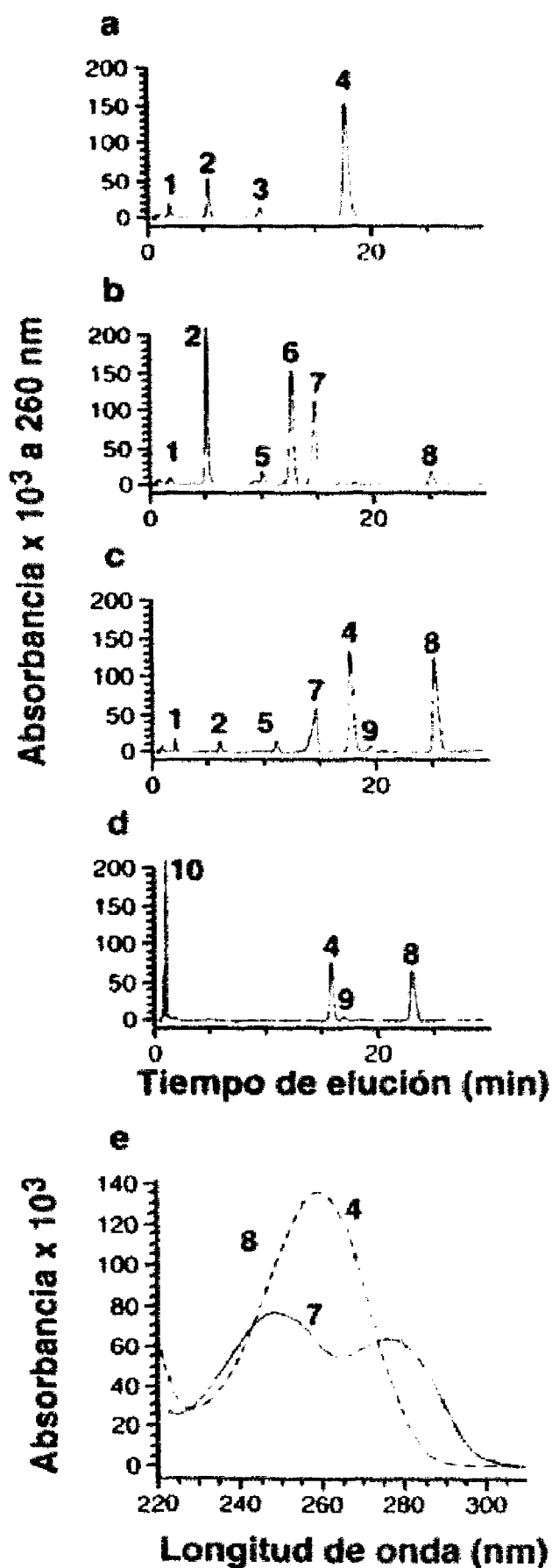


Figura 13. ATP γ S como sustrato de la T4 RNA ligasa

Entre otros componentes (ver Materiales y métodos), las mezclas de reacción contenían 200 U/ml RNA ligasa y dependiendo de la mezcla: 2 mM ATP (a), 2 mM ATP γ S + 2 mM XTP (b) y 2 mM ATP + 2 mM XTP (c). Después de incubar (durante 16 horas, la mezcla (c) se trató con 1 μ g de fosfatasa alcalina durante 2 h a 37° C (panel d). El análisis se llevó a cabo por HPLC. Los espectros UV correspondientes al Ap₄A (4), Ap₄X (8) y XTP (7) se indican en el panel e. Los espectros de los supuestos Ap₃A (3) y Ap₃X (9) fueron idénticos a los espectros de Ap₄A (4) y Ap₄X (8), respectivamente. Los números sobre los picos corresponden a los siguientes compuestos: (1) AMP; (2) ADP; (3) Ap₃A; (4) Ap₄A; (5) XDP; (6) ATP γ S; (7) XTP; (8) Ap₄X; (9) Ap₃X; (10) Ado + Ino.

La cantidad relativa de Ap_4X que se sintetizó en presencia de (ATP + XTP) o en presencia de (ATP γ S + XTP) fue de 100 y 10, respectivamente. La capacidad potencial del ATP γ S para formar el complejo E-AMP con la T4 RNA ligasa se analizó también utilizando ADP como sustrato.

4.1.e.3 ii Síntesis de Ap_3A en presencia de ATP γ S

Se prepararon 2 mezclas de reacción que contenían 1mM ATP + 2mM ADP (Fig. 14a) o 2mM ATP γ S + 2mM ADP (Fig. 14b). Después de incubar toda la noche las mezclas de ensayo se trataron con fosfatasa alcalina y se analizaron por HPLC (Fig. 14c,d). En estas condiciones, en presencia de ATP y ADP se formaron Ap_4A y Ap_3A en cantidades relativas de 100 y 130, respectivamente. En presencia de ATP γ S y ADP, no se sintetizó Ap_4A según era lo esperado, pero la cantidad de Ap_3A sintetizado fue sólo un 25% del formado en presencia de cantidades equivalentes de ATP y ADP. Al igual que ocurría con la síntesis de Ap_4N el ATP γ S no fue tampoco en este caso un buen donador de AMP para la síntesis de Ap_3A .

La formación del complejo E-AMP a partir de el ATP γ S resultó mucho menos eficaz con la T4 RNA ligasa que con la T4 DNA ligasa. Con este último enzima la síntesis de Ap_4G era únicamente un 30% menor en presencia de ATP γ S que en presencia de ATP (Madrid, 1999).

4.1.f Efectores de la reacción de síntesis de (di)nucleósido polifosfatos

4.1.f.1 Cationes divalentes

Mn^{2+} y Ca^{2+}

La síntesis de dinucleótidos requiere la adición de Mg^{2+} a la mezcla de ensayo (ver 4.1.b.4 y 4.1.c.3); el posible efecto de la adición de Mn^{2+} o Ca^{2+} en lugar de Mg^{2+} se ensayó en la síntesis de Ap_4A utilizando las condiciones descritas en la Tabla 1. Se observa que en presencia de Mn^{2+} , pero no de Ca^{2+} , la síntesis de dinucleótido puede alcanzar hasta un 50% de la máxima obtenida en presencia de Mg^{2+} .

Tabla 1. Síntesis relativa de Ap_4A en presencia de Mg^{2+} , Mn^{2+} o Ca^{2+}

<u>Cationes</u>	<u>1mM</u>	<u>5 mM</u>
Mg^{2+}	100	100
Mn^{2+}	30,8	49,4
Ca^{2+}	< 1	< 1

Las mezclas de ensayo contenían 1 mM ATP, 125 U/ml de T4 RNA ligasa, otros componentes como se describe en Métodos y las concentraciones de cationes indicadas. Tras 1 h de incubación se tomaron alícuotas que se analizaron por HPLC.

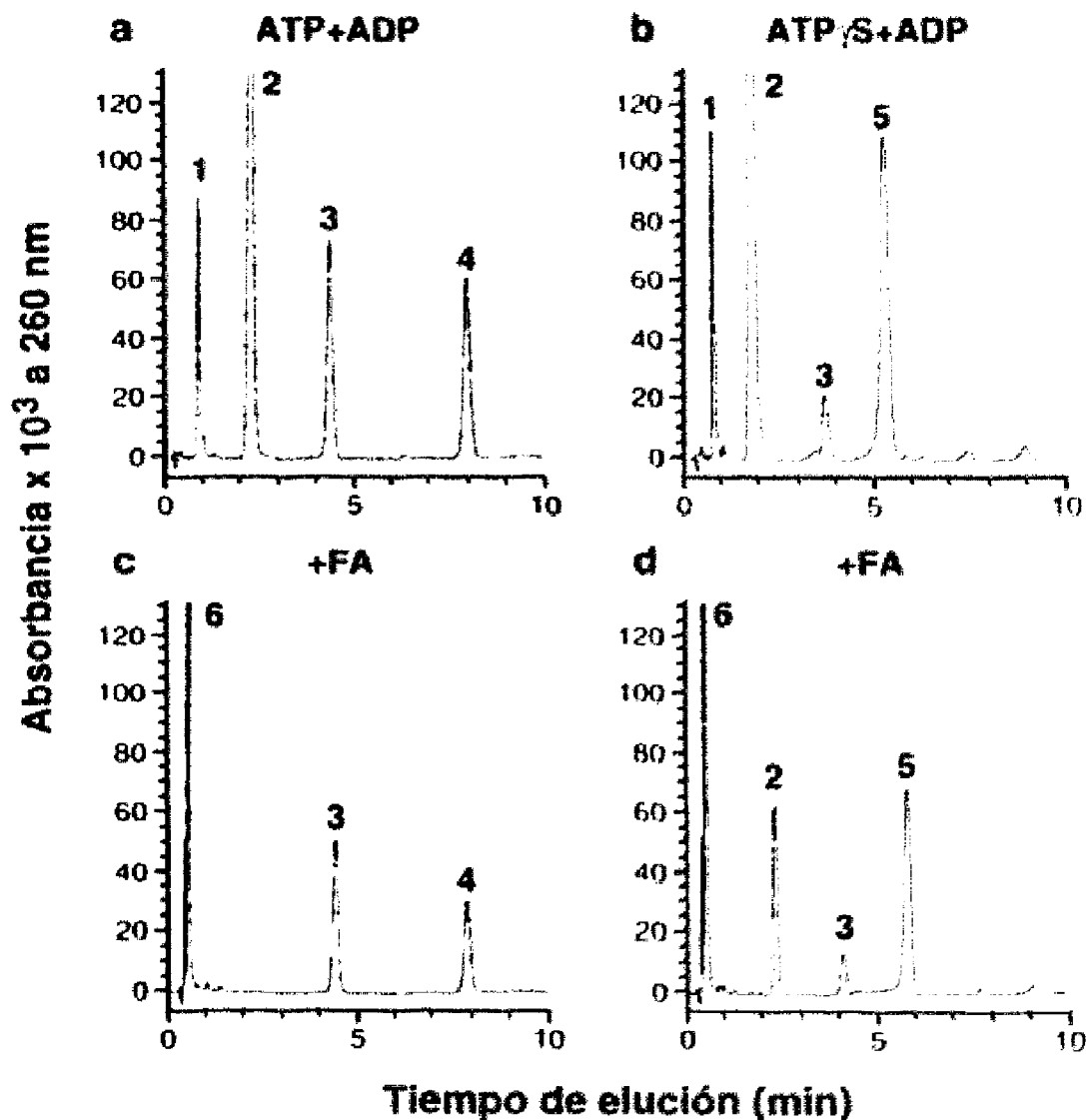


Figura 14. Síntesis comparativa de Ap_3A a partir de ADP y ATP o $ATP_{\gamma}S$

Entre otros componentes (ver Materiales y métodos), las mezclas de reacción contenían 200 U/ml RNA ligasa y 1 mM ATP + 2 mM ADP en el panel a, o 2 mM $ATP_{\gamma}S$ + 2 mM ADP en el panel b. Después de incubar durante 16 h, alícuotas de ambas mezclas de reacción se trataron con $1\mu g$ de fosfatasa alcalina (c y d respectivamente) y se analizaron por HPLC. Los números sobre los picos corresponden a los siguientes compuestos: (1) AMP; (2) ADP; (3) Ap_3A ; (4) Ap_4A ; (5) $ATP_{\gamma}S$; (6) Ado + Ino.

Zn^{2+}

El catión Zn^{2+} al igual que ocurría con la T4 DNA ligasa (Madrid, 1999) resultó ser un potente inhibidor de la reacción. Este efecto se estudió sobre la síntesis de Ap_4G , utilizando la mezcla de ensayo usual pero omitiendo el D11 por su capacidad de quelar este metal y disminuir su posible efecto. El resultado obtenido (Fig. 15) muestra que el $ZnCl_2$ inhibe la síntesis de Ap_4G con un valor de IC_{50} de aproximadamente 10 μM .

4.1.f.2 Cationes monovalentes

Na^+ , K^+ y Li^+

Los tres cationes indicados resultaron ser inhibidores de la síntesis de Ap_4A (Fig. 16) con valores de IC_{50} para el Na^+ , K^+ y Li^+ de aproximadamente 150 mM en cada caso. Esta inhibición debe estar relacionada con la observación hecha por Knopf (1977) según la cual concentraciones por encima de 0,25 M NaCl inhibían la formación del complejo E-AMP en el caso de la T4 DNA ligasa. La síntesis de Ap_4G mediante la T4 DNA ligasa es también inhibida por KCl y NaCl con valores de IC_{50} de aproximadamente 50 mM (Madrid, 1999).

4.1.f.3 Sulfato amónico

Fontes y col. (1998b) habían observado que el sulfato amónico era un inhibidor de la síntesis de dinucleósido polifosfatos catalizada por la acil-CoA sintetasa, posteriormente Madrid y col. (1998) verificaron que esta sal era también un inhibidor potente de la síntesis de dinucleótidos catalizada por la T4 DNA ligasa. Como todos los ensayos de síntesis de (di)nucleótidos polifosfatos conllevan la adición de pirofosfatasa y la fuente comercial que se utiliza de esta enzima consiste en una suspensión en 3,2 M de $(NH_4)_2SO_4$, hay que proceder, antes de su uso, a la eliminación de esta sal.

Al iniciar este trabajo con la T4 RNA ligasa nos pareció conveniente hacer un estudio previo para examinar la influencia que podría tener el sulfato

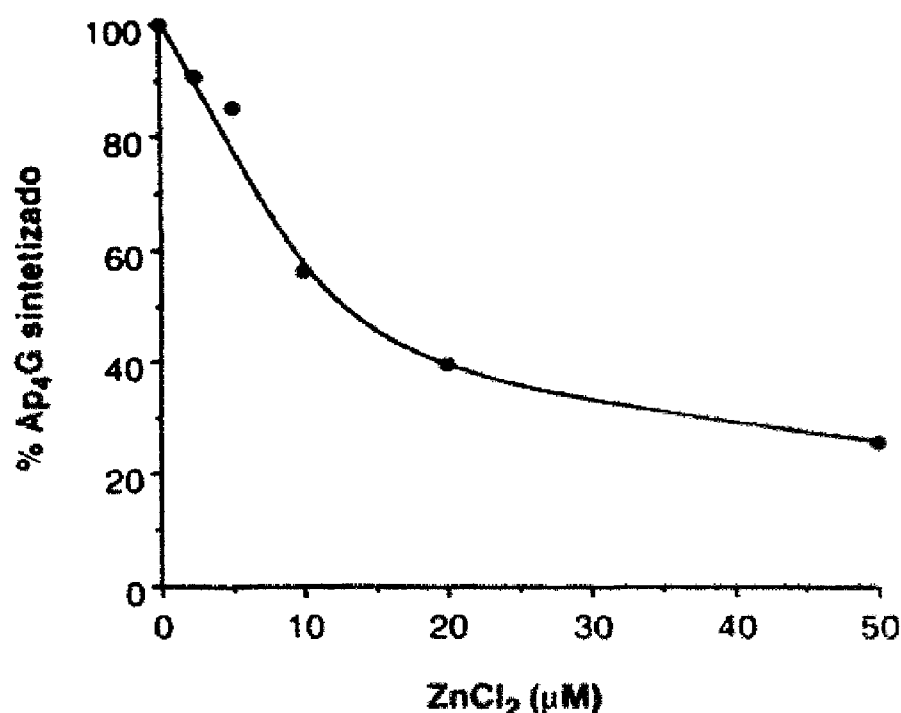


Figura 15. Inhibición por ZnCl_2 de la síntesis de Ap_4G catalizada por T4 RNA ligasa

Las mezclas de ensayo contenían 50 mM Tris-HCl pH 7,4; 0,02 mM (0.1 μCi) [$\alpha\text{-}^{32}\text{P}$] ATP; 5 mM MgCl_2 ; 1 mM GTP; 2 U/ml PPasa desalada; 50 U/ml T4 RNA ligasa y cantidades crecientes (0; 2,5; 5; 10; 20; 50) μM de ZnCl_2 . El análisis del Ap_4G sintetizado se realizó por TLC tomando alícuotas a diferentes tiempos.

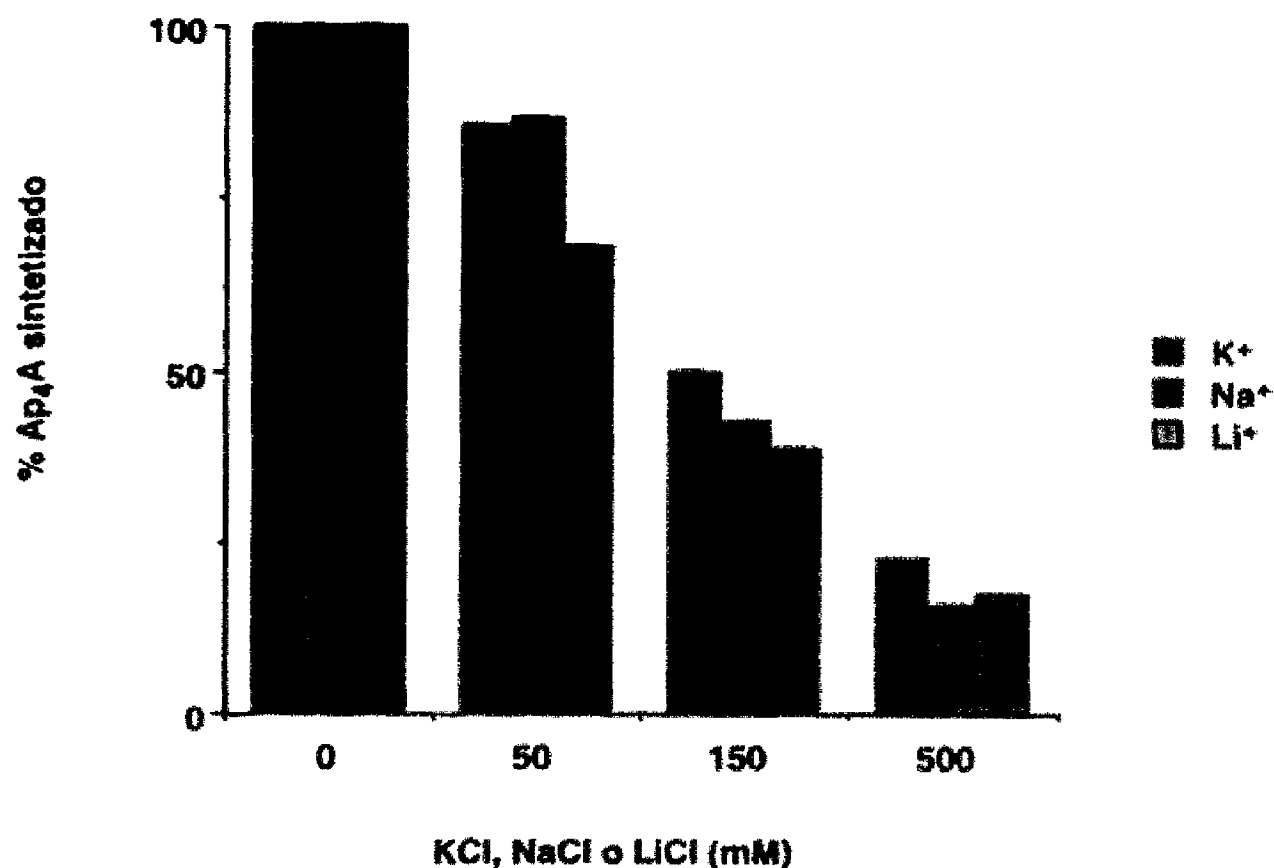


Figura 16. Efecto de concentraciones crecientes de KCl, NaCl o LiCl sobre la síntesis de Ap₄A catalizada por T4 RNA ligasa

Las mezclas de reacción (0,04 ml) contenían 50 mM Tris-HCl pH 7,4; 1 mM DTT; 5 mM MgCl₂; 1 mM ATP; 1 U/ml PPasa; 125 U/ml T4 RNA ligasa y concentraciones variables de KCl, NaCl o LiCl. El Ap₄A sintetizado se analizó por HPLC (Métodos 3.2.a.1).

amónico sobre la síntesis de Ap_4A . Para ello se prepararon mezclas de ensayo con las variables siguientes y cuyo resultado se recoge en la Fig.17

En (a) no se añadió PPasa

En (b) se añadió PPasa comercial de forma que la concentración final de sulfato amónico en el ensayo era de 16 mM.

En (c) se añadió una cantidad equivalente de PPasa desalada

En (d) se añadió PPasa igual que en b. y se suplementó con sulfato amónico hasta una concentración final en el ensayo de 32 mM

Los resultados obtenidos muestran como la presencia de PPasa activa la síntesis de Ap_4A (comparar a y c en Fig 17) y como el sulfato amónico es un inhibidor de dicha síntesis (comparar c con b y d). En presencia de 32 mM sulfato amónico (d) la síntesis de dinucleótido es inhibida un 55%.

El efecto de concentraciones crecientes de sulfato amónico sobre la síntesis de Ap_4A se analizó utilizando PPasa previamente desalada y concentraciones crecientes (16-133 mM) de sulfato amónico (Fig 18). A partir de estos datos se determinó un valor de IC_{50} de aproximadamente 30 mM.

4.1.1.4 Polifosfato P_{15}

El resultado obtenido al ensayar diversos polifosfatos como sustratos de la T4 RNA ligasa había mostrado que la preparación comercial del polifosfato P_{15} inhibía potentemente de la síntesis de Ap_4A (Fig.8A,d). Con el objeto de cuantificar esta inhibición se ensayaron concentraciones crecientes de P_{15} (10-200 μ M) sobre la síntesis de Ap_4A , en presencia de 2 mM $MgCl_2$ (Fig.19). Al utilizar una mezcla de polifosfatos, como es el caso de la preparación de P_{15} comercial, no es posible calcular la concentración libre de Mg^{2+} en el ensayo, por ello, con el fin de comprobar si el efecto inhibitor observado no pudiera ser debido a que disminuía la concentración de Mg^{2+} libre en el medio, se prepararon mezclas de ensayo conteniendo 0,1 mM P_{15} y concentraciones crecientes de Mg^{2+} (2; 2,5; 3; 3,5 y 4 mM). En estas condiciones 0,1 mM P_{15} inhibió un 55% la síntesis de Ap_4A , independientemente de la concentración de

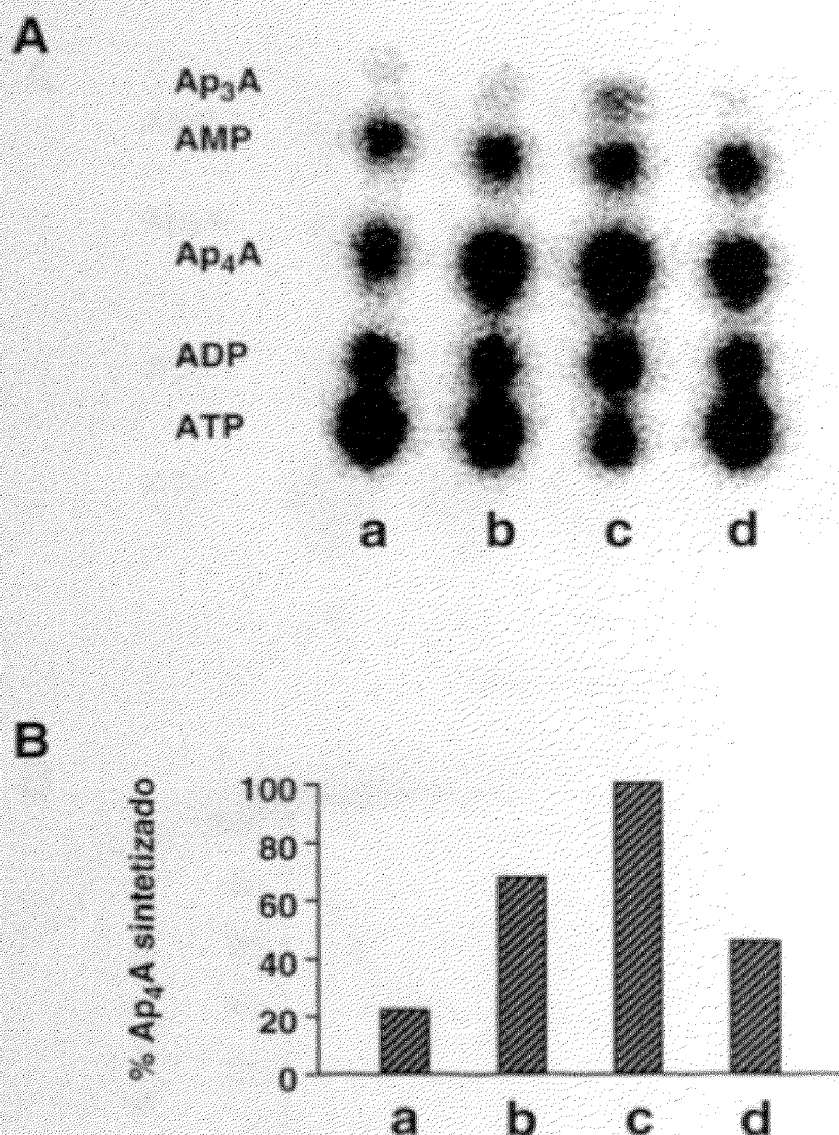


Figura 17. Efecto de la adición de pirofosfatasa y de sulfato amónico sobre la síntesis de Ap₄A

A. Las mezclas de reacción contenían 0,02 mM [α -³²P] ATP (0,1 μ Ci), 500 U/ml T4 RNA ligasa y las siguientes variables: (a) - PPasa; (b) + PPasa comercial (1 U/ml); (c) + PPasa desalada (1 U/ml); y (d) igual que en b + sulfato amónico hasta una concentración final de 32 mM. Los productos de reacción se analizaron por TLC.

B. Cuantificación del % de Ap₄A sintetizado a los 30 min de incubación.

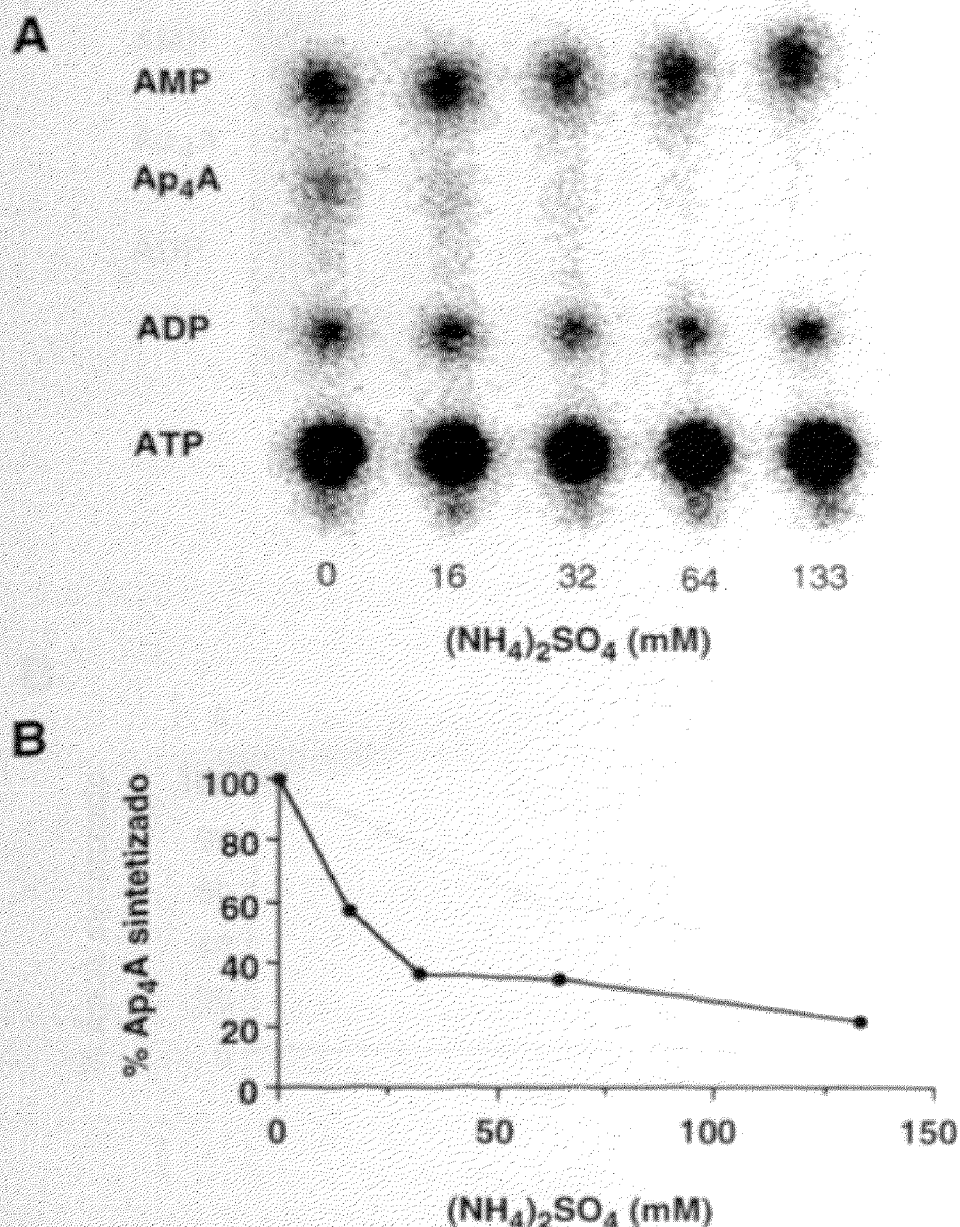


Figura 18. Inhibición por sulfato amónico de la síntesis de Ap₄A

A. Las mezclas de ensayo contenían en un volumen final: 50 mM Tris-HCl pH 7,4; 1 mM DTT; 0,01 mM (0,1 μ Ci) [α -³²P] ATP; 1 mM MgCl₂; PPasa desalada (1 U/ml), cantidades crecientes de sulfato amónico (mM) como se indica y T4 RNA ligasa (200 U/ml). Se incubó a 30 °C y los productos formados se analizaron por TLC. A la izquierda se indica la posición en que eluyen los correspondientes patrones. **B.** Cuantificación del % de Ap₄A sintetizado.

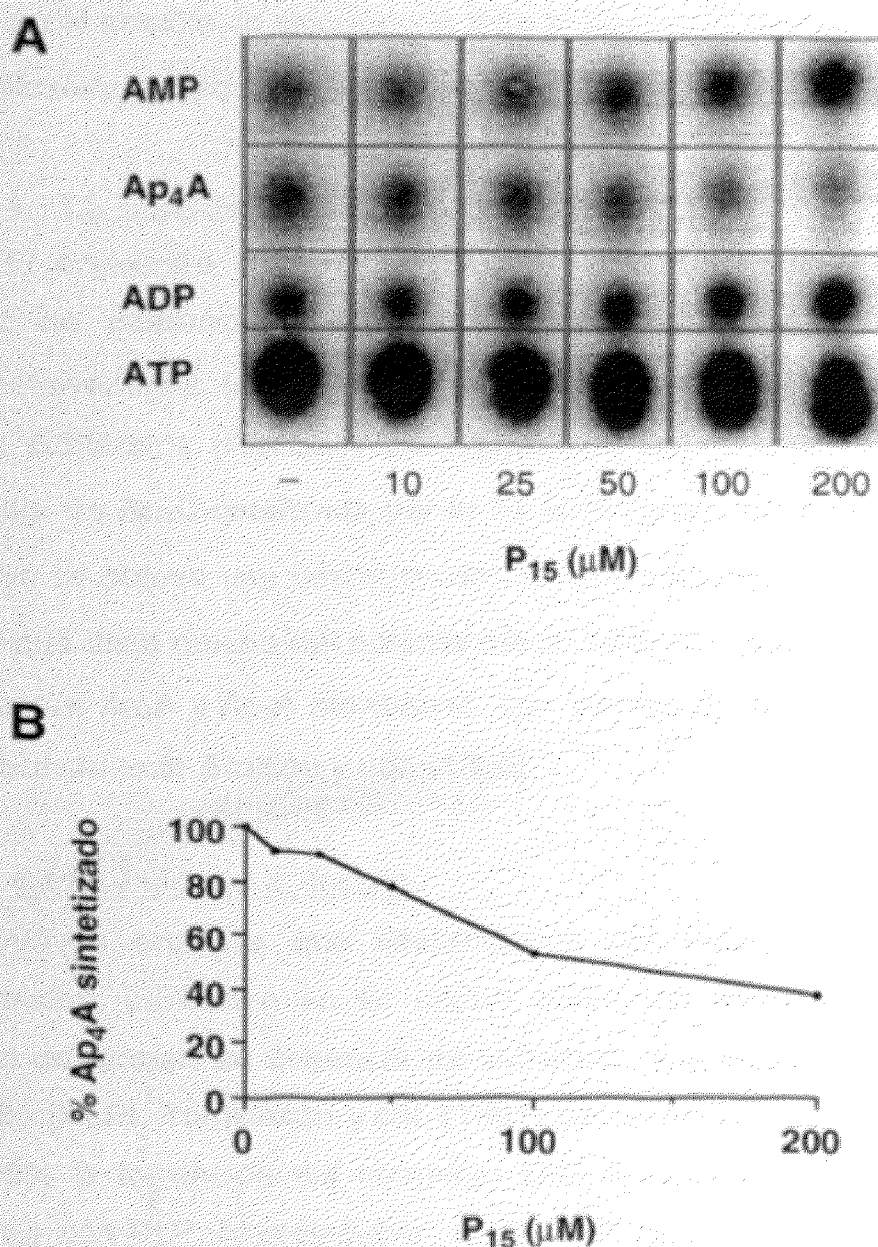


Figura 19. Inhibición por P₁₅ de la síntesis de Ap₄A

A. La mezcla de ensayo contenía: 50 mM Tris-HCl, 1 mM DTT, 0,02 mM ATP (0,1 μCi) [α-³²P] ATP, 2 mM MgCl₂, PPasa (1 U/ml), T4 RNA ligasa (200 U/ml) y cantidades crecientes de P₁₅ como se indica. Se incubó a 30°C y se tomaron alícuotas que se analizaron por TLC. **B.** Cuantificación de la inhibición por P₁₅ de la síntesis de Ap₄A, tomando los valores correspondientes a los 90 minutos de incubación.

Mg^{2+} en el ensayo, lo que parece indicar que la inhibición observada es debida al polifosfato y no a una disminución de Mg^{2+} libre en el ensayo

4.1.f.5 Suramina

El encuentro reciente de que la suramina, una molécula polianiónica capaz de interaccionar con aminoácidos cargados positivamente, inhibía competitivamente a algunas enzimas que usan nucleótidos (ATP, Ap_4A , Ap_3A) como sustratos (Rotllán y col. 1998), nos llevó a ensayar su efecto sobre la síntesis de Ap_4G catalizada por la T4 RNA ligasa. En nuestras condiciones de ensayo se obtuvo una inhibición del 50% en presencia de 50-100 μM suramina, valor que dista mucho del potente efecto inhibidor descrito para este compuesto sobre las Ap_4A y Ap_3A hidrolasas con valores de K_i de 5×10^{-6} y $3 \times 10^{-7} M$, respectivamente (Rotllán y col. (1998).

4.1.f.6 Piridoxal 5'-fosfato

Varios enzimas que interaccionan con nucleótidos, que actúan como sustratos, contienen en su centro activo una lisina particularmente reactiva capaz de formar, en ausencia de sustrato, una base de Schiff con el piridoxal fosfato (PLP). Tomkinson y col. (1991) describieron que 0,2 mM PLP inhibía en un 95% la formación del complejo DNA ligasa-I-AMP si se preincubaba esta enzima con PLP. Al preincubar la T4 RNA ligasa con 0,1 mM PLP durante 10 min se logró inhibir la síntesis de Ap_4G en un 52% (Fig. 20). Resultados similares habían sido obtenidos por Madrid (1999). Esta menor inhibición comparativamente a la obtenida por Tomkinson y col. (1991) podría ser debida a la inestabilidad del complejo E-PLP, ya que en los ensayos de síntesis de (di)nucleósido polifosfatos los tiempos de incubación suelen ser más largos.

4.1.g Inhibición de la síntesis de dinucleósido polifosfatos por ribonucleósido 5', 3'(2')-bisfosfatos

Como ya se describió al principio del apartado de Resultados la reacción catalizada por la T4 RNA ligasa consta de tres etapas [13], [14] y [15] lo que ha

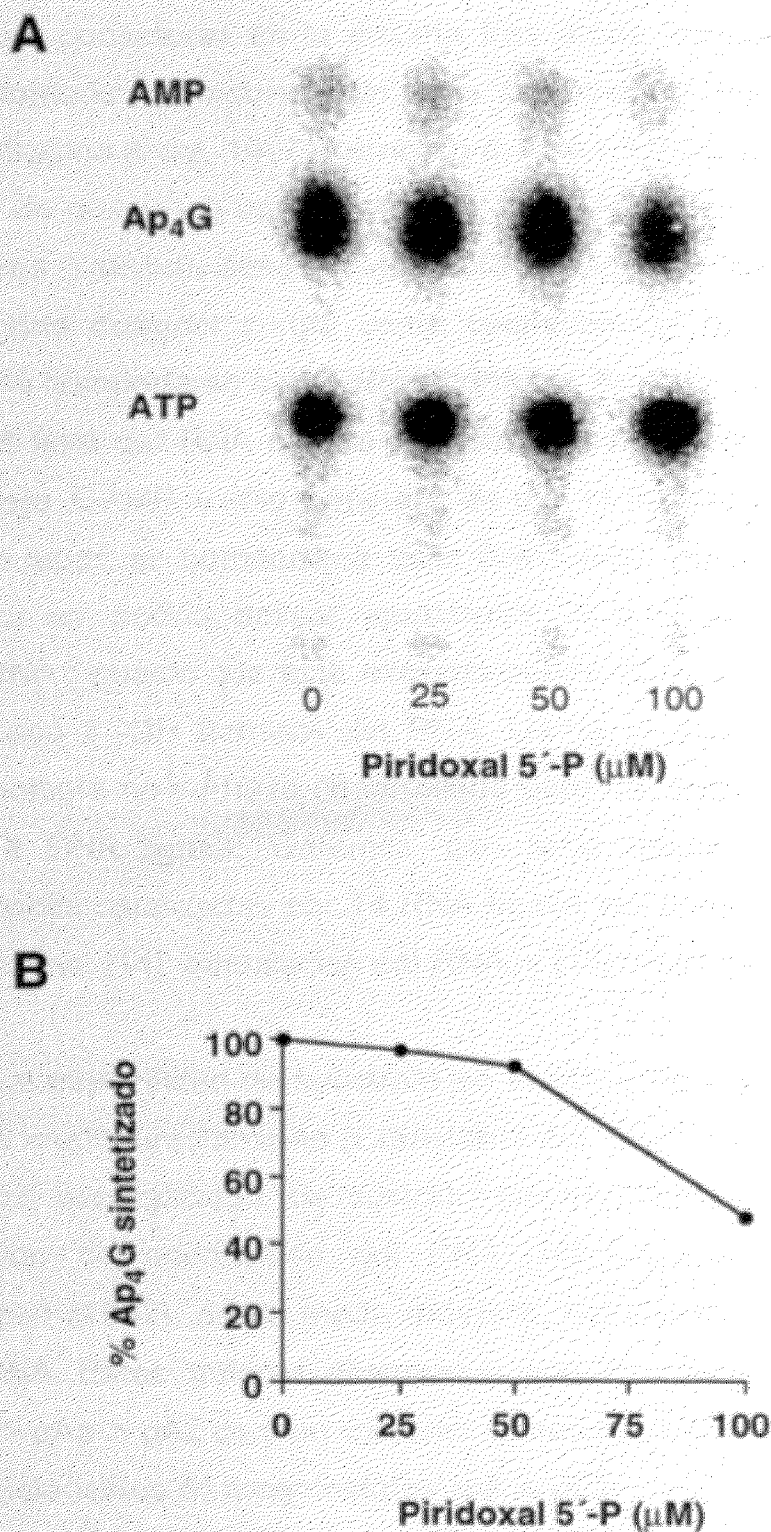


Figura 20. Inhibición de la síntesis de Ap₄G por piridoxal 5'-P

A. Las mezclas de reacción contenían 0,02 mM [α -³²P] ATP (0,1 μCi), 1 mM GTP, 40 U/ml T4 RNA ligasa y cantidades crecientes de piridoxal 5'-P. A los 30 min de incubación se analizaron los productos por TLC.

B. Cuantificación del Ap₄G sintetizado.

llevado a considerar en la enzima tres áreas activas: el área para el ATP, un área llamada *donadora* y un área llamada *aceptora* (Uhlenbeck & Gumpert 1982; Sugino & col. 1977; Kornberg & Baker 1992). Esta terminología deriva del hecho de que los grupos 5'-fosfato y 3'-OH terminales del RNA (o moléculas similares) se han denominado RNA *donador* y RNA *aceptor*, respectivamente. El término *donador* surgió como consecuencia de la capacidad potencial del RNA de comportarse como RNA *donador*. Aunque si se mira desde otro ángulo, el 5'-P final del RNA estaría primero actuando como un *aceptor* de AMP del complejo E-AMP, y sólo después de que la formación del complejo E-AppRNA tuviera lugar, se comportaría este RNA como *donador*. Según esto el término *aceptor* se podría aplicar igualmente al 5'-P terminal modificado del RNA (AppRNA) puesto que este extremo puede comportarse también como *aceptor* del grupo 3'-OH terminal del RNA. Llama la atención el hecho de que esta terminología no se haya desarrollado para las reacciones similares catalizadas por T4 DNA ligasa. Creemos que sería menos confuso denominar a las reacciones catalizadas por T4 RNA ligasa del modo siguiente: [13] adenilación del enzima, [14] adenilación del RNA, y [15] unión del RNA.

La especificidad de sustrato en la etapa de adenilación del enzima [13] se puede medir directamente (Cranston & col. 1974 y ver apartado 4.1.e.1).

La especificidad de sustrato del denominado 5'-p-RNA *donador* en la reacción de adenilación del RNA [14] fue determinada por Uhlenbeck & Gumpert (1982), de un modo indirecto, estudiando la reacción global de unión del RNA. Estos autores observaron que los ribonucleósidos 3',5'-bisfosfatos ($pCp > pAp > pA2'p$) eran mejores aceptores del AMP del complejo E-AMP que los nucleósidos 5'-monofosfatos (pA o pC).

Según lo anterior el mecanismo síntesis de p_4A (partiendo de ATP y P_3) o de Ap_4N (partiendo de ATP y NTP) se podría interpretar de dos maneras: a) reversión de la reacción de adenilación del enzima (reacción [13]) es decir el complejo E-AMP transfiere el AMP a P_2 , P_3 , p_3A , p_3G , p_2A , etc. con formación de ATP, p_4A , Ap_4A , Ap_4G , Ap_3A , etc., respectivamente, sin que aparentemente haya necesidad del sustrato *donador* o del área *donadora* del enzima o, b) que las mismas reacciones tuviesen lugar después de que el P_3 (o NTP) se hubieran

ubicado en el área *donadora* del enzima, y fueran allí adenilados por el complejo E-AMP, sin embargo la especificidad de sustrato del área *donadora* estudiada por Uhlenbeck & Gumpert (1982) no apoyan esta segunda posibilidad.

Según lo anterior, un sustrato considerado como *donador* en la reacción de ligación de RNA, susceptible por tanto de ser adenilado, sería de esperar que se comportara como inhibidor de la síntesis de (di)nucleósido polifosfatos. Se probaron por tanto, como inhibidores de la síntesis de Ap_4A , concentraciones variables (0,01-0,25 mM) de ribonucleósidos 3',5'-bisfosfatos (pCp, pAp, pA2'p) (RNA *donadores* o compuestos capaces de aceptar el AMP del complejo E-AMP) (Fig.21). Como en nuestras condiciones experimentales (ver Materiales y Métodos), el Ap_4A y los supuestamente sintetizados Ap_2Cp , Ap_2Ap , $Ap_2A2'p$, migraban en la misma posición (resultados no mostrados) se hizo necesario un tratamiento previo de la mezcla de reacción con fosfatasa alcalina antes de separar por TLC los productos formados. De esa forma se logró una buena separación entre el Ap_4A y los $Ap_2(C)A$. Los resultados obtenidos con pAp como inhibidor de la síntesis de Ap_4A se muestran en la Fig. 21a. Evidencias experimentales similares se obtuvieron con pCp y pA2'p (resultados no mostrados). Con estos experimentos, se calculó la inhibición de la síntesis de Ap_4A por los tres ribonucleósidos 3',5'-bisfosfatos (Fig. 21b). El inhibidor más potente de la síntesis de Ap_4A fue el pCp seguido por pAp y pA2'p, lo que está en buena correlación con su eficacia como sustratos *donadores* de T4 RNA ligasa determinada por Uhlenbeck & Gumpert (1982).

En otra serie de experimentos se mantuvo constante la concentración (0,02mM) de pCp, pAp, pA2'p y de ATP y se determinaron las velocidades iniciales de síntesis de Ap_2Cp , Ap_2Ap y $Ap_2A2'p$ que fueron iguales a 12,5, 3,5 y 0,15 $nmol \cdot min^{-1} \cdot mg^{-1}$ de proteína respectivamente, mientras que la velocidad inicial de síntesis de Ap_4A fue de 1,06 (en presencia de pCp y pAp) y de 1,2 $nmol \cdot min^{-1} \cdot mg^{-1}$ (en presencia de pA2'p) (Fig.22A). En ausencia del nucleósido bisfosfato, la velocidad de síntesis de Ap_4A procedente del ATP fue de 1,25 $nmol \cdot min^{-1} \cdot mg^{-1}$ (Fig. 22A). En la Fig. 22B se muestra el resultado de incubar

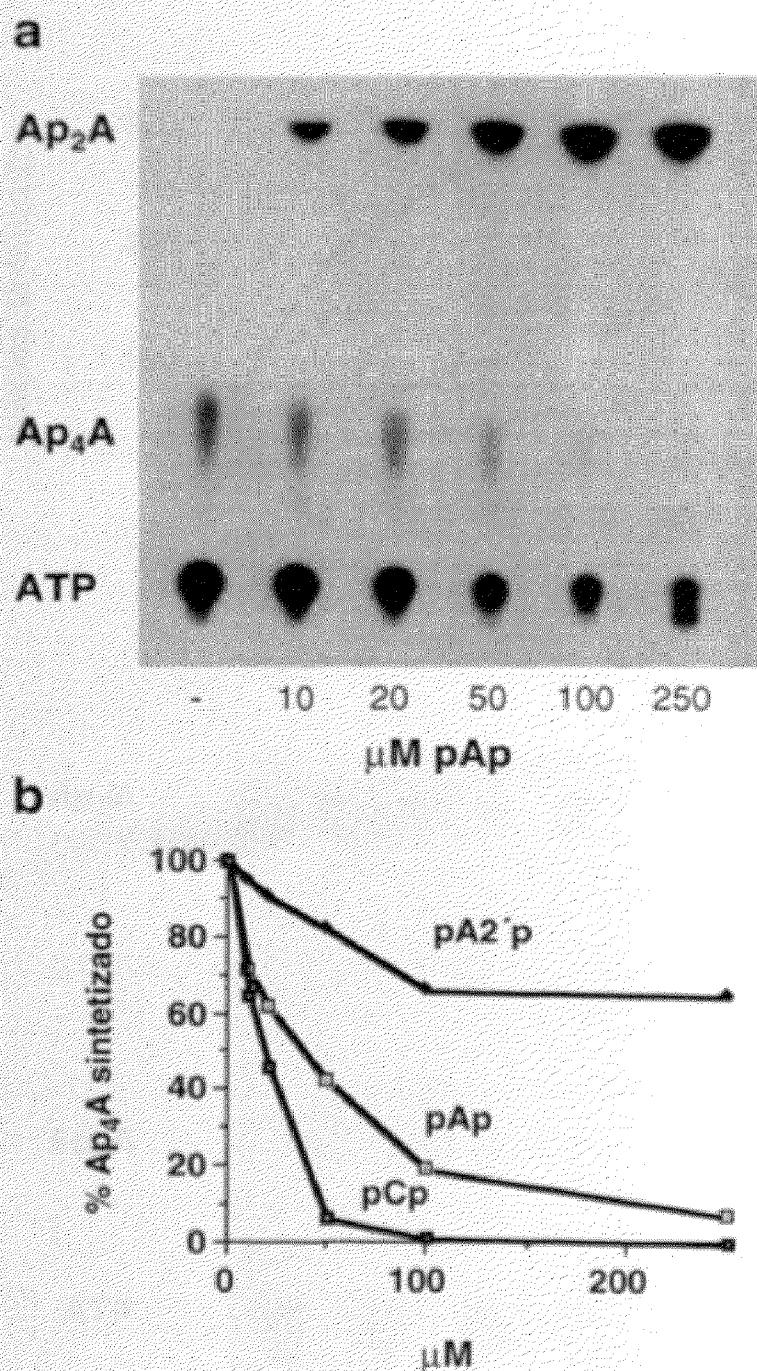


Figura 21. Inhibición de la síntesis de Ap₄A por nucleósidos 3'(2'), 5'-bisfosfatos

Las mezclas de reacción contenían [α -³²P] ATP (0,02 mM), otros componentes como se indica en Materiales y métodos, 100 U/ml T4 RNA ligasa y concentraciones variables de pAp, pA₂'p o pCp. Después de 60 min de incubación, las mezclas de reacción se trataron con 1 μg de fosfatasa alcalina durante 1 h a 37°C, se analizaron por TLC y la radiactividad correspondiente a Ap₄A, y al Ap₂A, o Ap₂C formados se cuantificó en un Instantlmager. (a) Autorradiografía de la placa de TLC del experimento que se hizo con pAp como inhibidor. (b) Inhibición relativa de la síntesis de Ap₄A por pAp, pA₂'p o pCp.

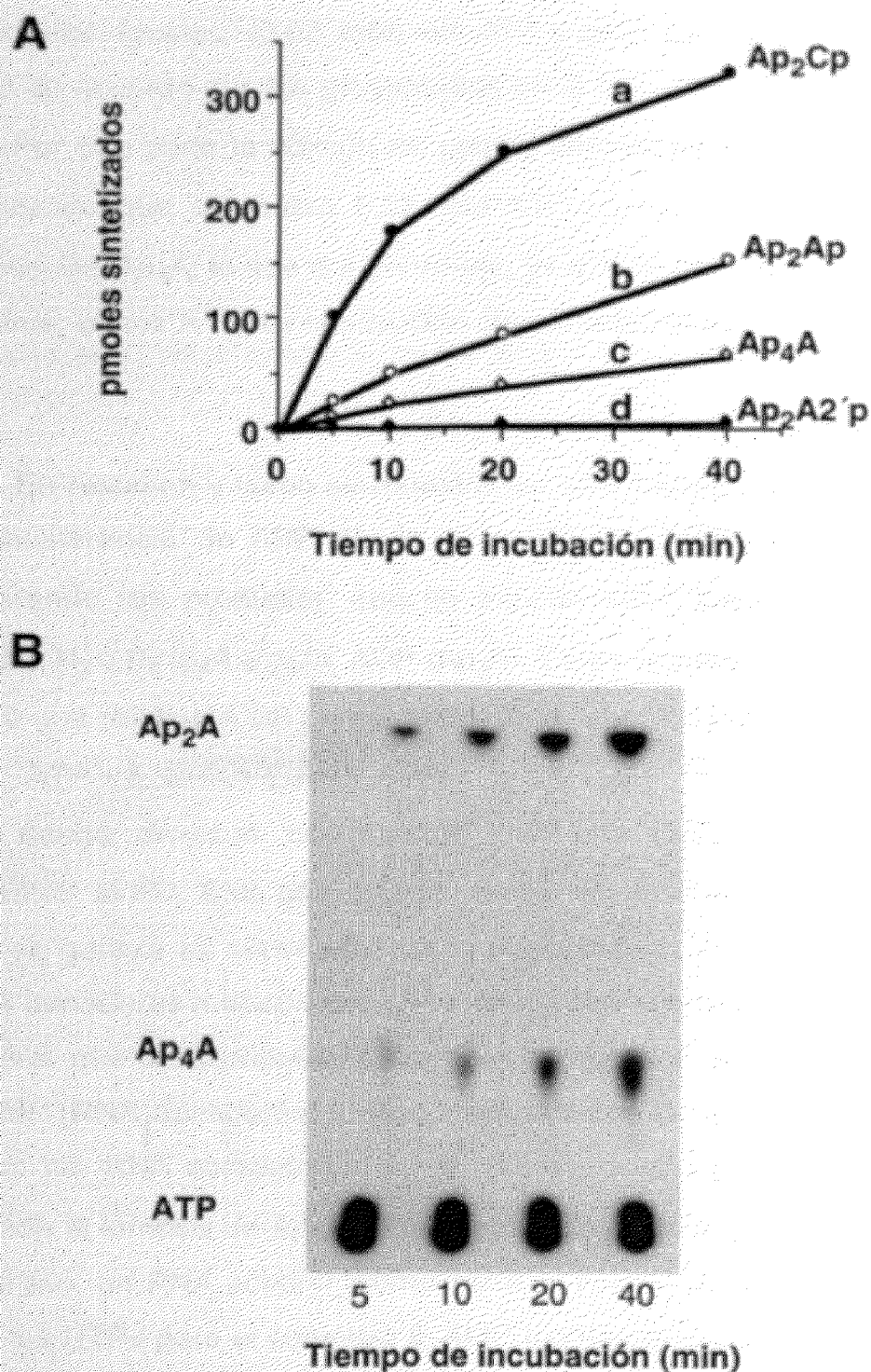


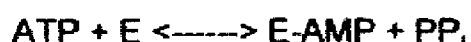
Figura 22. Síntesis de Ap₂Cp, Ap₂Ap, Ap₂A2'p o Ap₄A con T4 RNA ligasa: linealidad con el tiempo

A. Se incubaron 4 mezclas de ensayo que contenían 0,02 mM [α -³²P] ATP (0,1 μ Ci), otros componentes como se indica en Métodos, 100 U/ml T4 RNA ligasa y 0,02 mM de los siguientes nucleósidos 3'(2'), 5'-bisfosfatos según las distintas mezclas: (a) pCp; (b) pAp; (c) control sin nucleósido bisfosfato; (d) pA2'p. A los tiempos indicados se tomaron alícuotas que se trataron y analizaron como se indica en el pie de la Fig 21. **B.** Autorradiografía de la placa de TLC del ensayo que contenía el ribonucleósido 3',5'-bisfosfato pAp.

cantidades iguales (0,02 mM) de ATP y pAp. En conjunto, estos resultados están de acuerdo con los presentados en la Fig. 21

Por otra parte la adición de poly(A) defosforilado (2, 6, y 20 µg) a mezclas de ensayo que contenían 0,02 mM ATP no tuvieron efecto alguno sobre la síntesis del Ap₄A, lo que era previsible, ya que al carecer de 5'-P en su extremo terminal, el poli A no es susceptible de ser adenilado

En resumen y como se muestra en este trabajo, la T4 RNA ligasa cataliza la transferencia de AMP desde el complejo E-AMP a diversos compuestos, generando los productos que se indican entre paréntesis: ATP (Ap₄A), NTP (Ap₄N), P₃ o P₄ (p₄A o p₅A), ADP (Ap₃A). Estas reacciones se pueden interpretar como una reversión del primer paso de la reacción [13],



donde diversos compuestos con una cadena de polifosfato pueden substituir al PP_i. Este primer paso de la reacción es favorecido cuando el PP_i que se genera es eliminado por la pirofosfatasa y no requiere la presencia de RNA *donadores* o *aceptores*. De acuerdo con las reacciones [13] y [14], sería de esperar que los compuestos capaces de aceptar también el AMP del complejo E-AMP (RNA *donadores*) fuesen inhibidores de la reacción, ya que tanto los NTP como los RNA competirían por el mismo complejo E-AMP. Este fue el caso cuando la síntesis de Ap₄A se ensayó en presencia de: pCp, pAp y pA2'p. Por el contrario, un RNA *aceptor*, como sería el poly(A) defosforilado, que no compete con los NTPs para el complejo E-AMP (comparar ecuaciones [13] y [15]) no sería y de hecho no fue inhibidor de la síntesis de dinucleósido polifosfatos.

4.2 DINUCLEOSIDO POLIFOSFATOS COMO ACEPTORES DE pCp DEL Ap₂Cp

Estaba descrito en la literatura (Kaufmann & Kallenbach (1975); Kikuchi & col. 1978; England & Uhlenbeck (1978); Uhlenbeck & Gumport 1982) que el sustrato más pequeño capaz de ser adenilado por la T4 RNA ligasa en la

reacción [14] era un nucleósido 3',5'-bisfosfato, y el mínimo aceptor en la reacción de unión de RNA [15] era un trinucleósido difosfato (NpNpN) con grupos hidroxilo libres en ambos extremos finales 3' y 5'. Esto nos llevó a plantear si un dinucleósido polifosfato que tiene en su molécula dos extremos 3'-OH podría comportarse como un análogo de RNA en la reacción [15]. Para estudiar esta posibilidad utilizamos pCp como RNA donador y distintos dinucleósido polifosfatos como RNA aceptores.

4.2.a. *Gp₄G como un RNA aceptor potencial*

Para ensayar la posibilidad de que el intermediario E-AppCp, que se forma en presencia de ATP y pCp (Uhlenbeck & Gumpert (1982), fuera capaz de donar el residuo pCp al grupo 3'-OH del Gp₄G se prepararon mezclas de reacción que contenían ATP (0,5 mM); pCp (0,5 mM) en ausencia (Fig. 23A, a-e) o presencia de 1 mM Gp₄G (Fig. 23B, f-j). Estas mezclas se analizaron después de 2, 4, 8, y 19 h de incubación. En ausencia de Gp₄G se observó la formación del esperado AppCp, que se caracterizó por su posición cromatográfica y por su espectro ultravioleta (Fig. 23A b-e, pico 4), y por la desaparición simultánea de pCp (Fig. 23, pico 2) y ATP (Fig. 23, pico 3). En concordancia con resultados mostrados más arriba, en estas condiciones experimentales se formó también una pequeña cantidad de Ap₄A (Fig. 23A, b-e, pico 5). En presencia de Gp₄G se sintetizó AppCp gradualmente (Fig. 23, g-j, pico 4) hasta alcanzar un máximo alrededor de las 4 h de incubación, a partir de entonces este compuesto empezó a disminuir y apareció un nuevo compuesto (Fig. 23B, h-j, pico 8) que debía corresponder probablemente a un derivado citidílico del Gp₄G. El pico 6 que aparece en todos los cromatogramas que contienen Gp₄G (Fig. 23B) corresponde a Gp₃G, compuesto que contamina la preparación de Gp₄G utilizada.

Si en la Fig. 23 se comparan los cromatogramas del lado izquierdo (sin Gp₄G) con los del lado derecho (con Gp₄G), se observa un mayor pico de AMP (pico 1) en el segundo caso, como resultado del consumo de AppCp al citidililar el Gp₄G y la consiguiente liberación de AMP.

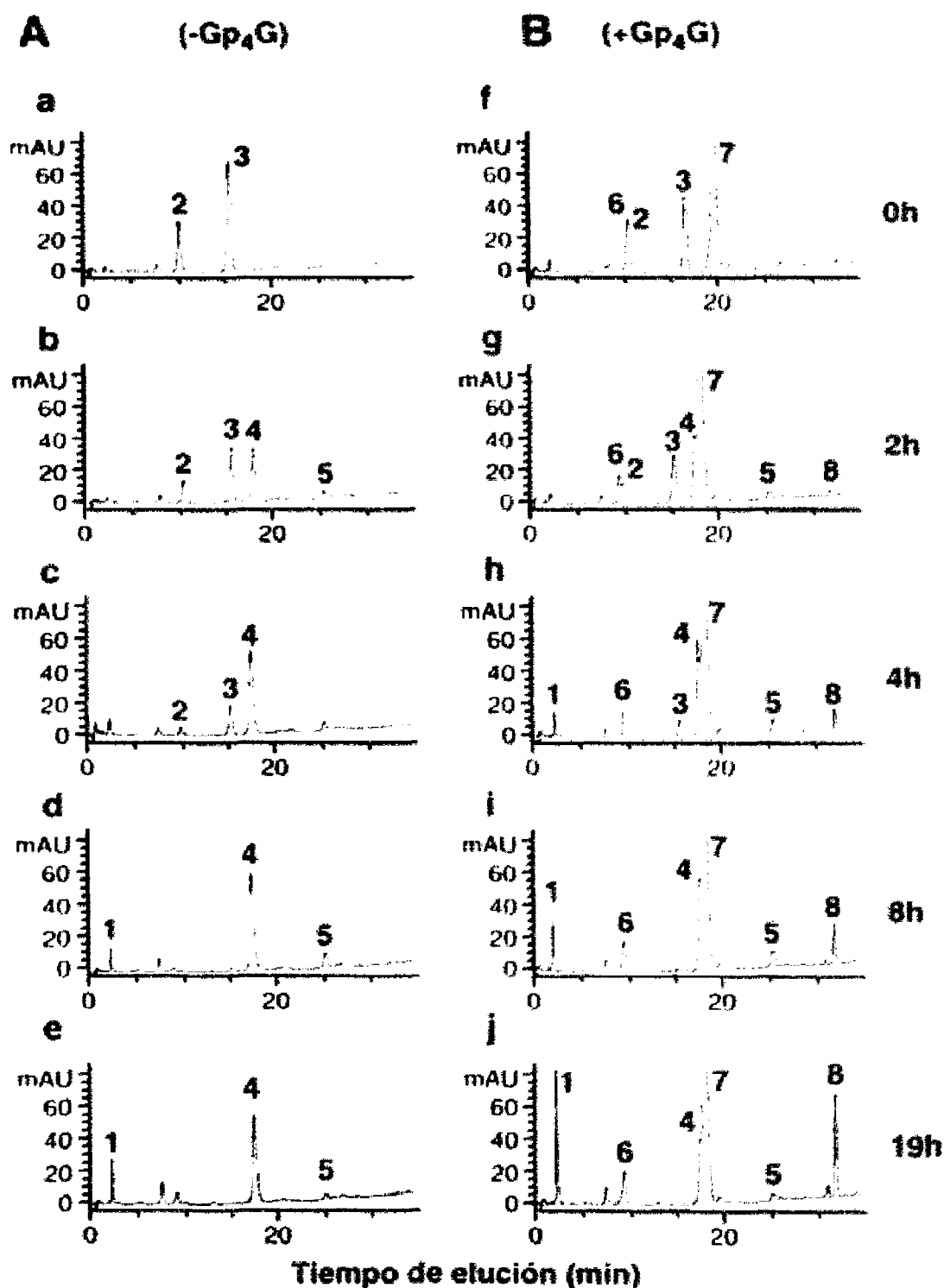


Figura 23. Síntesis de un citidil derivado de diguanosina tetrafosfato catalizado por T4 RNA ligasa

Las mezclas de ensayo (0,04 ml) contenían 165 U/ml de T4 RNA ligasa, 0,5mM ATP, 0,5mM pCp, ausencia (A) o presencia de 1mM Gp₄G (B) y otros componentes como se describe en Métodos. Se incubó a 30°C y a los tiempos indicados se analizaron alícuotas por HPLC utilizando una columna de Hypersil ODS (2,1 x 100 mm). Los números sobre los picos cromatográficos corresponden a los siguientes compuestos: 1, AMP; 2, pCp; 3, ATP; 4, Ap₂Cp; 5, Ap₄A; 6, Gp₃G; 7, Gp₄G; 8, Gp₄GpCp.

4.2.b Síntesis y caracterización de $GppppG-3'-p-5'-C-3'-p$ (Gp_4GpCp)

Para comprobar si el pico 8 de la Fig. 23 correspondía efectivamente a un citidil derivado del Gp_4G se procedió del siguiente modo. En primer lugar se obtuvo la cantidad de producto necesaria para proceder a su caracterización, para ello se preparó una mezcla de ensayo (0.3 ml), similar a la mostrada en la Fig. 23 B, se incubó a 30°C durante 22h, se aplicó a una columna de Mono Q y se eluyó con un gradiente lineal de bicarbonato amónico como se describe en Material y Métodos (3.2.c.3). En estas condiciones (Fig. 24), al eluir con el gradiente 0.5-1 M de bicarbonato amónico, se separaron dos compuestos de los cuales el que eluía con un tiempo de retención de 12.5 min correspondía a Gp_4G y el pico con un tiempo de retención de 15.4 min correspondía al presunto citidil derivado de Gp_4G , ya que presentaba un espectro de UV idéntico al pico 8 de la Fig. 23B. Este último compuesto se recogió y concentró por liofilización.

El procedimiento seguido para su caracterización se recoge en la Fig. 25. En la Fig. 25a se muestra el cromatograma correspondiente al pico 8 purificado, cuyo espectro ultravioleta corresponde al de un compuesto que contiene 2 moles de G y un mol de C. (Fig. 26). Cuando este compuesto se trató con fosfatasa alcalina (Métodos 3.2.c.3) cambió su posición cromatográfica pero no hubo variación en su espectro ultravioleta (Fig. 25 b, pico 9), lo que era compatible con la eliminación del fosfato terminal en el presunto compuesto Gp_4GpCp . Después de inactivar la fosfatasa alcalina calentando la mezcla a 100 °C, ésta se trató con fosfodiesterasa de veneno de serpiente. El Gp_4GpCp (pico 9) puede ser hidrolizado por esta enzima, en las posiciones que se indican mediante las flechas (Fig. 25), dando lugar a una mezcla de productos intermedios (pC, pG, Gp_4G , pppGpC, pppG) y como productos finales pC y pG. En concordancia con esta posibilidad después de un tratamiento extensivo con fosfodiesterasa, se encontraron únicamente pC (pico 10) y pG (pico 11).

Otra alícuota del pico 8 purificado se trató en primer lugar con fosfodiesterasa. Dado que esta enzima requiere un residuo nucleósido 5'-fosfato con un grupo 3'-OH libre, a partir de Gp_4GpCp se podrían generar únicamente pG (pico 11) y p_3GpCp (pico 12) (Fig. 25,d); tras inactivar la fosfodiesterasa y tratar la mezcla de reacción con fosfatasa alcalina se

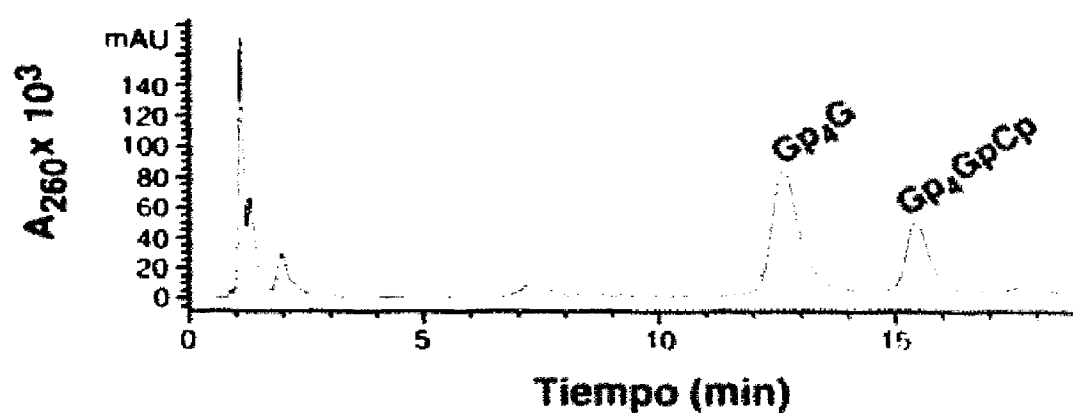


Figura 24. Purificación de Gp₄GpCp

La mezcla de ensayo y su purificación en columna Mono Q se describe en Métodos 3.2.c.3. Al aplicar un gradiente de bicarbonato amónico (0,5 - 1 M) se separan el Gp₄G ($t_R = 12,5$) y el Gp₄GpCp ($t_R = 15,4$).

Figura 25. Caracterización del Gp₄GpCp. Tratamiento con fosfatasa alcalina y fosfodiesterasa

Se prepararon dos mezclas de ensayo que contenían 0,057 A₂₆₀ unidades de Gp₄GpCp en un volumen final de 0,21 ml (a); una de las mezclas se trató con fosfatasa alcalina (FA) (b) y a continuación con fosfodiesterasa (FDE) (c). La otra mezcla de ensayo se trató con FDE (d) y después con FA (e). El análisis de los productos de reacción se hizo por HPLC (ver Métodos 3.2.d.3?). Los números sobre los picos cromatográficos corresponden a los siguientes compuestos: 8, Gp₄GpCp; 9, Gp₄GpC; 10, pC; 11, pG; 12, pppGpCp; 13, Guo; 14, GpC; 15, pCpGp₄GpCp; 16, CpGp₄GpC.

obtuvieron 2 picos que correspondieron, como era de esperar, a guanosina (Guo (pico 13) y GpC (pico 14) (Fig 25, e)

Para identificar los picos obtenidos después del tratamiento con fosfatasa alcalina o/y fosfodiesterasa se utilizó la co-elución con patrones (Guo, pC, pG, Gp₄G GpC) y el análisis de sus espectros al ultravioleta (Fig 26). Los espectros de los compuestos que contienen sólo una G (picos 11 y 13 (Fig 25)) : 2G + 1C (picos 8 y 9 (Fig 25)): 1G + 1C (picos 12 y 14 (Fig 25)) o sólo C (pico 10 (Fig 25)), se distinguen fácilmente, lo que ha sido de gran ayuda a la hora de elucidar las estructuras predichas.

La estructura del Gp₄GpCp (pico 8, (Fig 25) fue también confirmada al tratar una alícuota con 0,3M KOH durante 18 h a 37°C. Después de neutralizar la mezcla de reacción con ácido perclórico se analizó su contenido por cromatografía (HPLC)(Métodos 3.2.c.3) y se identificaron 2 picos principales que correspondían a Cp y Gp₄Gp y un tercer pico de Gp₄G, lo que estaba de acuerdo con la rotura preferente de los enlaces 3',5'-fosfodiéster por este procedimiento. Cuando se trató la mezcla, posteriormente, con fosfatasa alcalina se obtuvieron dos picos mayoritarios de Gp₄G y citidina, y una pequeña cantidad de guanosina (Fig 27).

4.2.c Síntesis de p-3'-C-5'-p-3'-GppppG-3'-p-5'-C-3'-p (pCpGp₄GpCp)

Al analizar por cromatografía de HPLC las mezclas de ensayo procedentes de incubar T4 RNA ligasa en presencia de ATP, pCp, Gp₄G se observaba, dependiendo de las condiciones, un pequeño pico (pico 15, Fig. 25) que migraba a la derecha del Gp₄GpCp (pico 8). El valor del cociente entre las áreas del pico 8 /pico 15 era alrededor de 10, dependiendo de las condiciones experimentales. La pequeña cantidad de compuesto 15, hizo difícil el poder obtenerlo en cantidad suficiente para poder realizar una caracterización similar a la descrita para el Gp₄GpCp en el apartado 4.2.b; sin embargo supusimos que el pico 15 correspondía a una molécula de Gp₄G a la que en ambos extremos 3'-OH se había ligado un grupo pCp dando lugar a pCpG₄GCp. A esta conclusión se llegó por las siguientes razones: 1) en presencia de fosfatasa

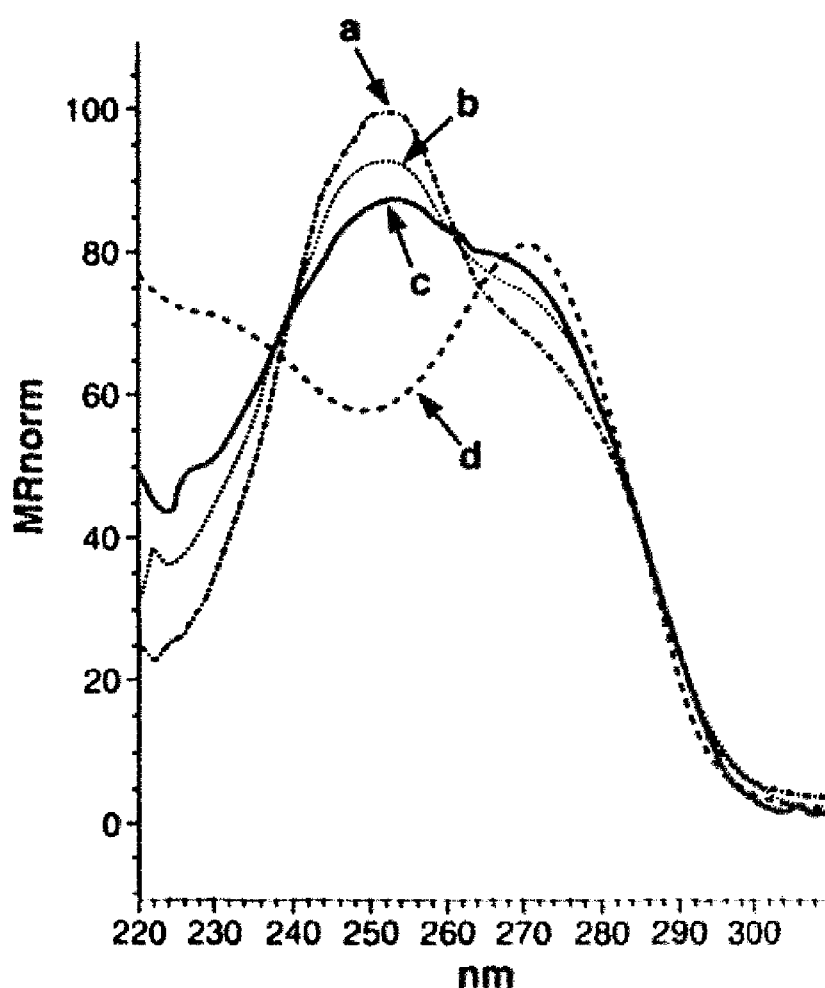


Figura 26. Espectros ultravioleta del Gp_4GpCp y de sus productos de degradación después del tratamiento con fosfatasa alcalina y fosfodiesterasa

Los espectros UV de los picos cromatográficos indicados, corresponden a compuestos que contienen: (a) solo G (picos 11 y 13); (b) $2G + 1C$ (picos 8 y 9); (c) $1G + 1C$ (picos 12 y 14); (d) solo C (pico 10). La naturaleza de los picos cromatográficos es la que se indica en la Fig 25.

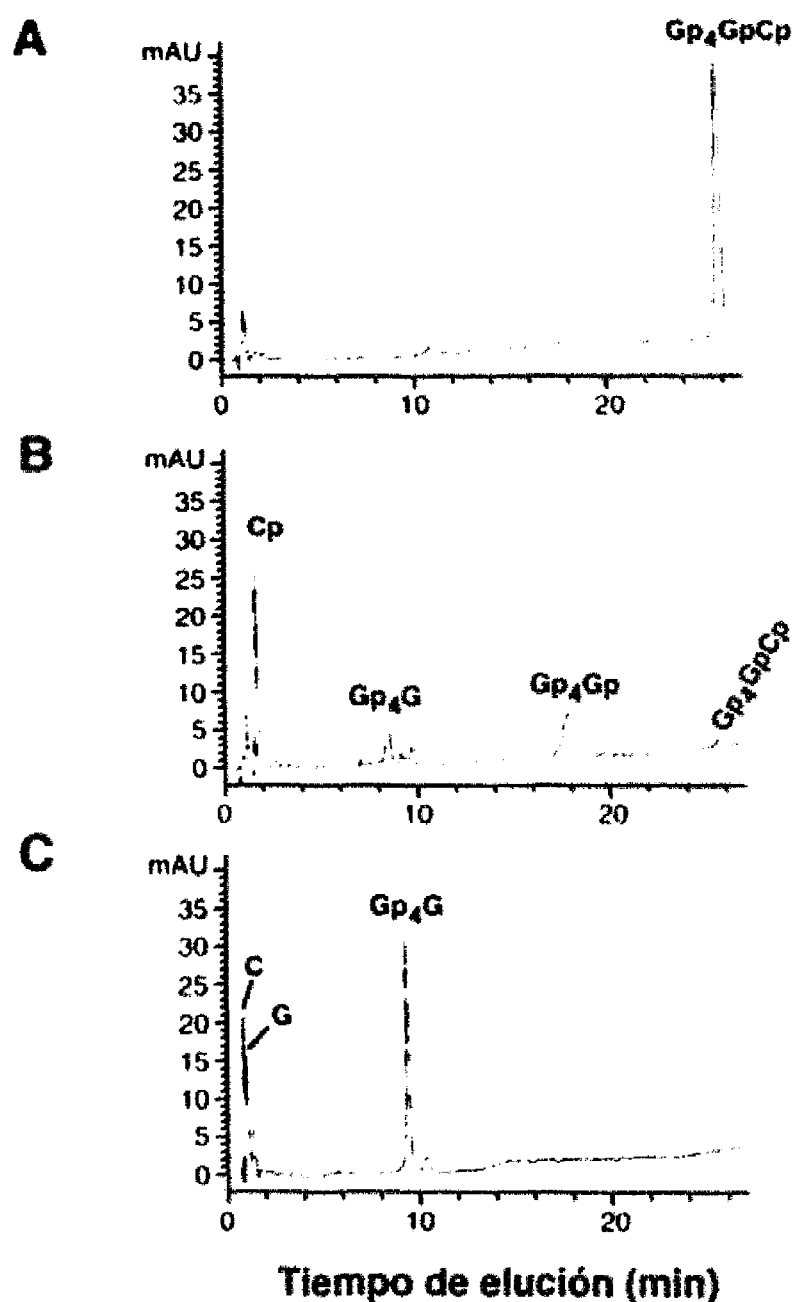


Figura 27. Caracterización del Gp_4GpCp . Tratamiento con 0,3 N KOH y fosfatasa alcalina

Una solución que contenía 0,018 A_{260} unidades de Gp_4GpCp (A); se trató con 0,3 N KOH durante 18 horas a 37°C (B) y posteriormente con fosfatasa alcalina. (C) El análisis de los productos de reacción se hizo por HPLC (Ver métodos 3.2.c.3).

alcalina este compuesto se transformaba en otro con un tiempo de retención menor pero con el mismo espectro (Fig. 25,b, pico 16) ii) los espectros ultravioleta de ambos picos (15 y 16) eran compatibles con la presencia en la molécula de 2 residuos de G y 2 de C (Fig 26,c)

4.2.d Características de la reacción de síntesis de Gp_4GpCp

4.2.d.1 Influencia de la pirofosfatasa y del sulfato amónico

De forma similar a lo que ocurre en la síntesis de (di)nucleótidos utilizando T4 RNA ligasa la síntesis de Gp_4GpCp es activada (2,5 veces) en presencia de pirofosfatasa e inhibida un 60% por 16 mM sulfato amónico.

4.2.d.2. Linealidad con el tiempo

La síntesis de Gp_4GpCp a lo largo del tiempo se ensayó en presencia de 0.5 mM ATP-Mg, 0.5 mM pCp, 1 mM Gp_4G y 165 U/ml de T4 RNA ligasa. Se tomaron alícuotas a las 2,4,8 y 19 h de incubación a 30°C que se analizaron por HPLC (Fig. 28).

4.2.d.3 Linealidad con la cantidad de enzima

La síntesis de Gp_4GpCp se ensayó en presencia de concentraciones crecientes de T4 RNA ligasa e incubando durante 15h, con el resultado que se recoge en la Fig. 29.

4.2.d.4 Síntesis de Ap_2Cp . Linealidad con el tiempo

En los ensayos mostrados hasta ahora la síntesis de Gp_4GpCp se había llevado a cabo incubando simultáneamente ATP, pCp y Gp_4G . Este procedimiento no era el más adecuado si se quería determinar la afinidad del enzima para el Gp_4G o el Ap_2Cp , ya que la concentración de este último compuesto variaba con el tiempo de incubación, aumentando a medida que se sintetizaba a partir de ATP y pCp, para después disminuir a medida que se consumía para formar el Gp_4GpCp . Por consiguiente pareció más adecuado, dado que el Ap_2Cp no es un compuesto comercial, utilizar Ap_2Cp preformado en el mismo experimento.

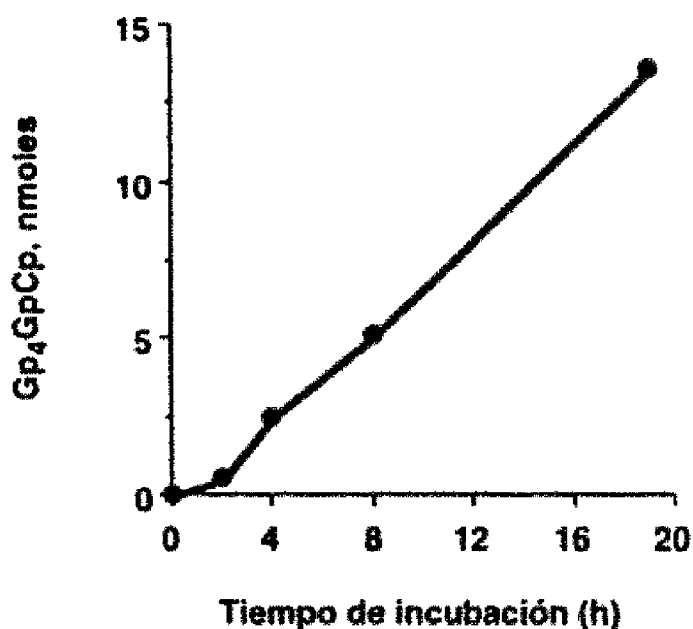


Figura 28. Síntesis de Gp₄GpCp. Linealidad con el tiempo

Las mezclas de ensayo (0,1 ml) contenían 0,5 mM ATP-Mg; 0,5 mM pCp, 5 mM MgCl₂, 1 mM Gp₄G, 165 U/ml de T4 RNA ligasa y el resto de los componentes como se describe en Métodos. Se incubó a 30°C y a los tiempos indicados se analizaron alícuotas por HPLC.

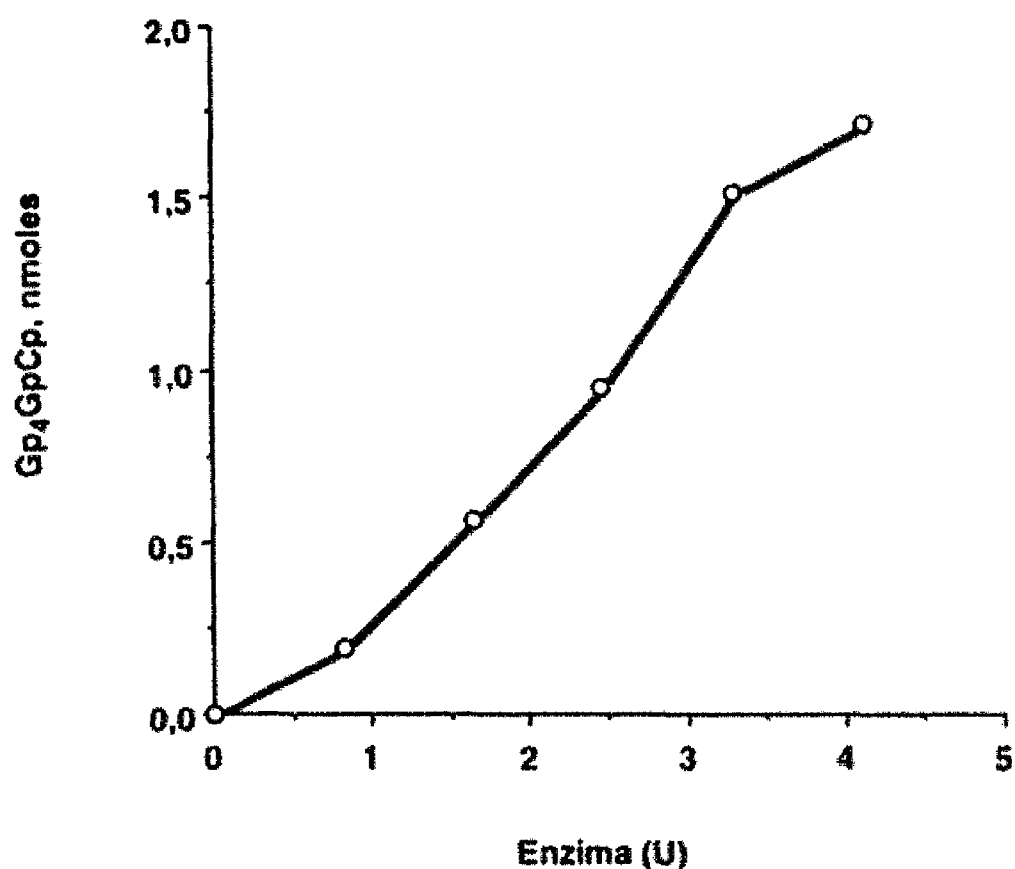


Figura 29. Síntesis de Gp₄GpCp. Linealidad con la cantidad de enzima

Las mezclas de ensayo (0,02 ml) contenían: 50 mM Tris-HCl, 1 mM DTT, 0,5 mM ATP-Mg, 0,5 mM pCp, 5 mM MgCl₂, 0,5 mM Gp₄G, 1 U/ml PPasa desalada y cantidades crecientes de T4 RNA ligasa. Se incubaron las mezclas a 30°C durante 15 horas, y se analizaron por HPLC.

Para determinar el tiempo necesario para lograr que todo el ATP y el pCp presentes en la mezcla de reacción se transformaran en Ap₂Cp, se incubaron 0.5 mM ATP-Mg, 0.5 mM pCp, (los restantes componentes, omitiendo Gp₄G, como se indica en Métodos 3.2 c.2) en presencia de 200 U/ml de T4 RNA ligasa. A los 5, 10, 20, 40, 80 y 120 min de incubación a 37°C se tomaron partes alícuotas que se analizaron por HPLC. En estas condiciones, después de 2h de incubación todo el ATP y el pCp se habían transformado en Ap₂Cp (Fig. 30), la velocidad de síntesis de Ap₂Cp, fue solamente un 15% inferior a la actividad ligasa.

4.2.d.5 Determinación de la K_m aparente para el Gp₄G

El estudio de la velocidad de síntesis de Gp₄GpCp en función de concentración de Gp₄G se llevó a cabo como sigue. Se prepararon mezclas de reacción que contenían 1 mM ATP-Mg, 1 mM pCp, y 5 mM MgCl₂ y se incubaron durante 3h a 30°C en presencia de 200 U/ ml de enzima para preformar el sustrato Ap₂Cp. Seguidamente las distintas mezclas se suplementaron con cantidades variables de Gp₄G (0, 0.25, 0.75, 2 y 4 mM). Los productos formados se analizaron después de 3 y 6 horas adicionales de incubación (Fig. 31). Los datos obtenidos después de 3 h de incubación fueron los utilizados para calcular el valor de la K_m . En ese tiempo la cantidad máxima de Gp₄G consumido fue menor del 8%, y la de Ap₂Cp fue de un 17% en presencia de 4 mM Gp₄G. El valor de K_m aparente determinado para el Gp₄G, en estas condiciones, fue de 4 mM. El pico 6 en la Fig 31 corresponde al Gp₃G que contamina al Gp₄G utilizado, por eso su tamaño aumenta a medida que aumenta la concentración de Gp₄G en el ensayo.

4.2.d.6. Determinación de la K_m aparente para Ap₂Cp

Para llevar a cabo este ensayo se prepararon mezclas de reacción que contenían concentraciones variables (0.25, 0.5, 1 y 2 mM) de ATP-Mg y pCp, 5 mM MgCl₂ y 200 U/ml de enzima. Se preincubaron durante 3 h para formar en cada caso la cantidad correspondiente de Ap₂Cp. (Fig 32A). Transcurrido este

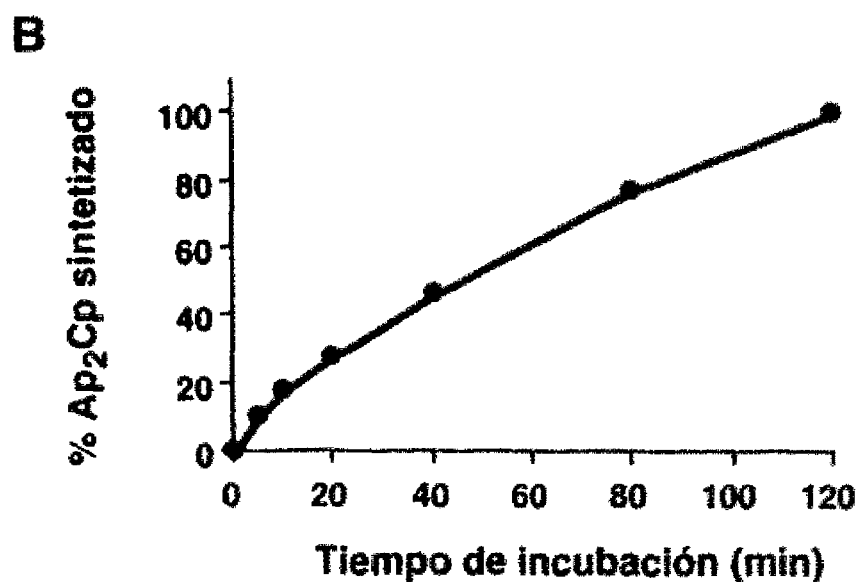
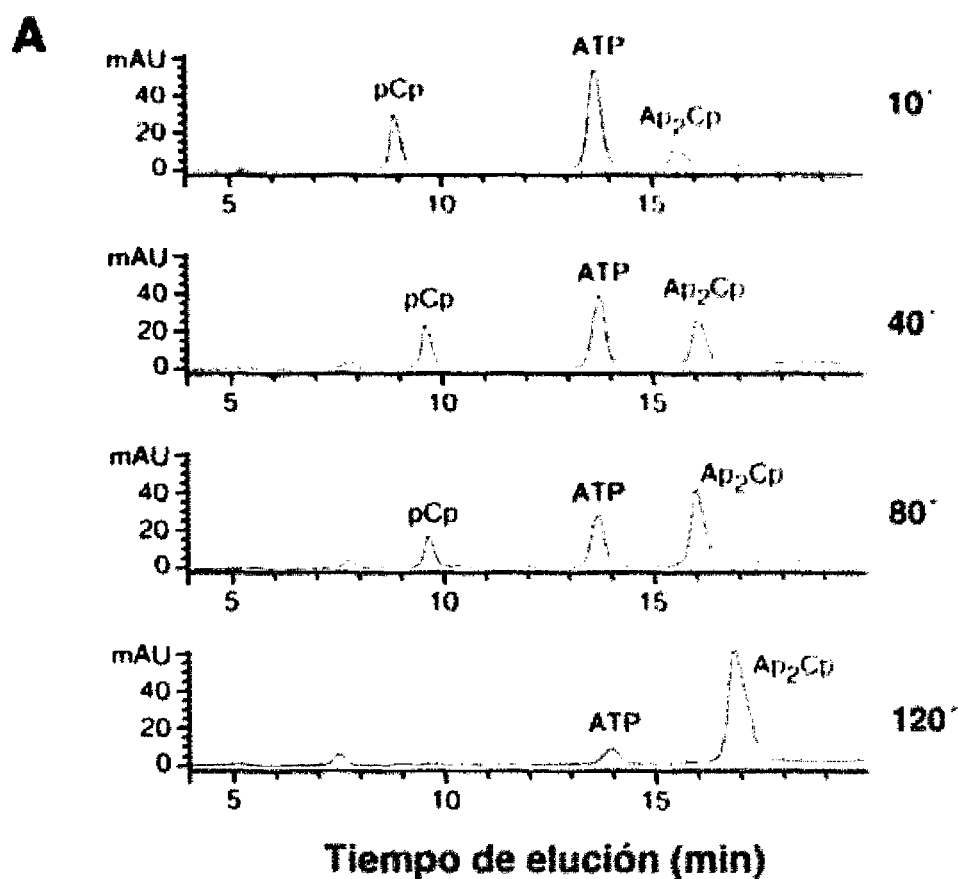


Figura 30. Síntesis de Ap_2Cp . Linealidad en el tiempo.

A. Una mezcla de ensayo contenía 50 mM Tris-HCl pH 7,4; 1 mM DTT; 0,5 mM ATP- $MgCl_2$; 0,5 mM pCp; 1 U/ml PPasa desalada; 5 mM $MgCl_2$; 0,01 mg/ml BSA y 200 U/ml T4 RNA ligasa. Se incubó la mezcla a 37°C y se tomaron alícuotas a los 5, 10, 20, 40, 80 y 120 min de incubación que fueron analizadas por HPLC. **B.** Cuantificación de los resultados obtenidos en **A.**

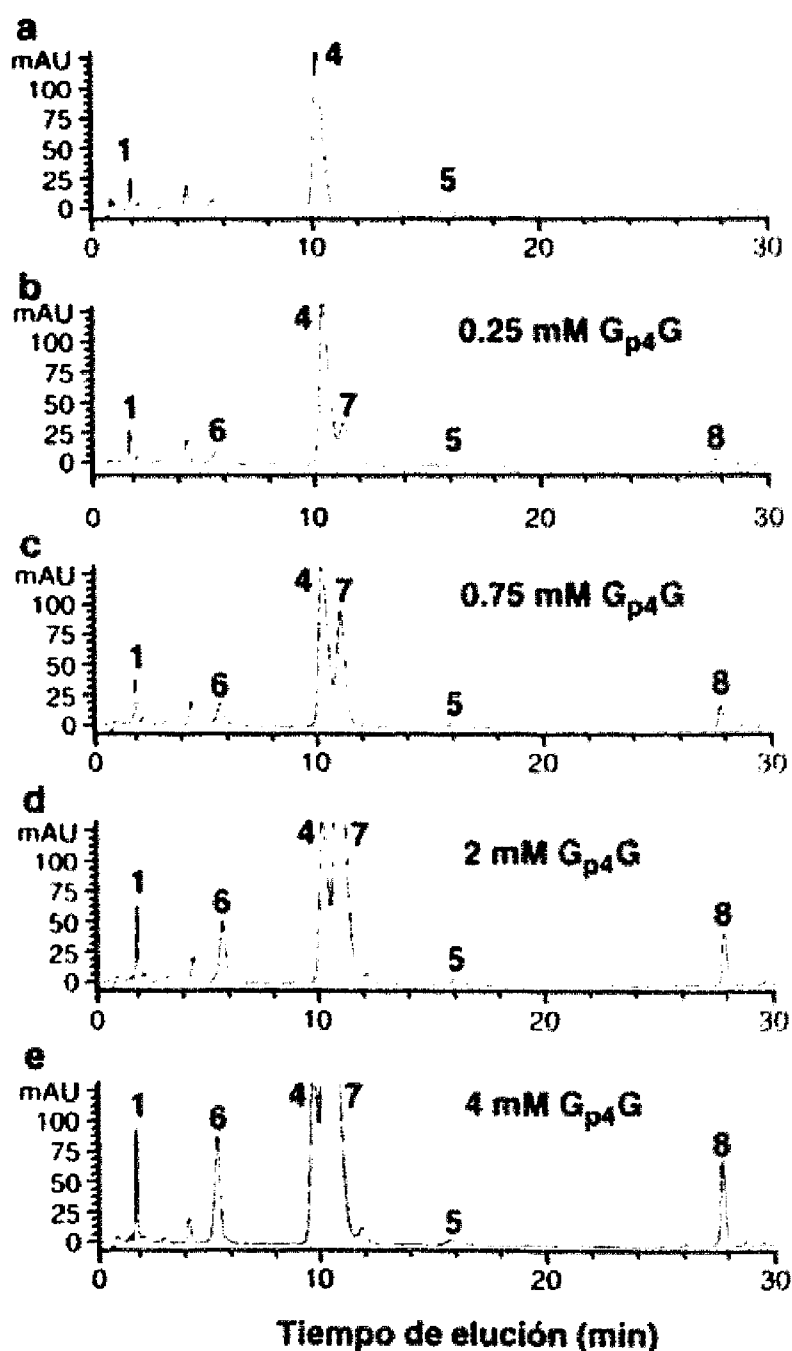


Figura 31. Influencia de la concentración de Gp_4G en la síntesis de Gp_4GpCp

Las mezclas de ensayo (0,04 ml) contenían 1mM ATP-Mg; 1mM pCp; 5mM $MgCl_2$; 200 U/ml T4 RNA ligasa, el resto de los componentes indicados en Métodos y se incubaron durante 3 h a 30°C. Seguidamente se añadieron concentraciones crecientes de Gp_4G y se continuó la incubación a 30°C. Transcurridas 3 h se tomaron alícuotas que se analizaron por HPLC. Los números sobre los picos cromatográficos corresponden a los siguientes compuestos: 1, AMP; 4, Ap_2Cp ; 5, Ap_4A ; 6, Gp_3G ; 7, Gp_4G ; 8, Gp_4GpCp .

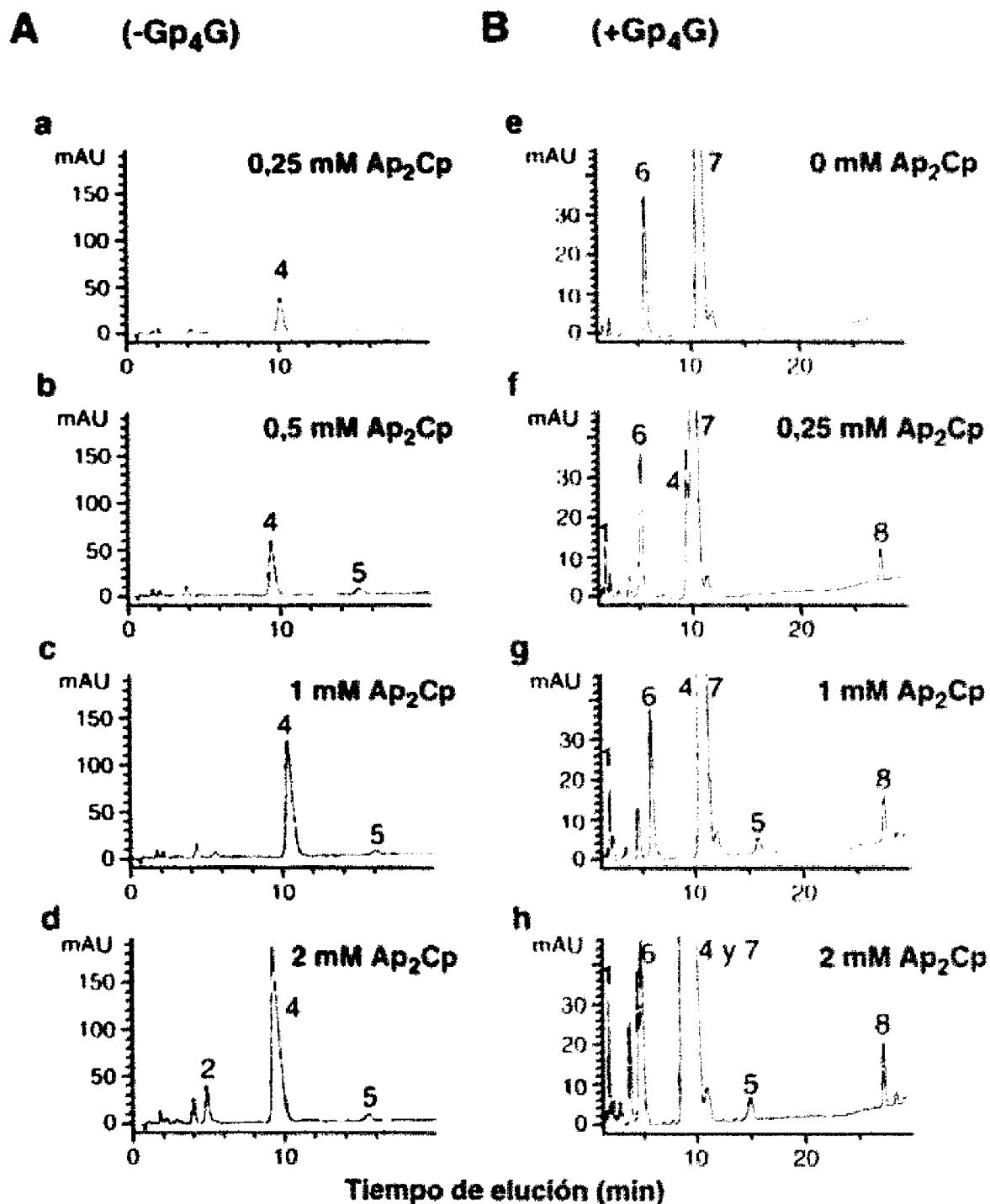


Figura 32. Influencia de la concentración de Ap₂Cp en la síntesis de Gp₄GpCp

Las mezclas de ensayo contenían: 5 mM MgCl₂; 0,01 mg/ml BSA; 210 U/ml T4 RNA ligasa, concentraciones crecientes de ATP-MgCl₂ y pCp (0; 0,25; 0,5; 1; 2) mM y el resto de los componentes indicados en Métodos; se incubaron a 30°C durante 3 horas (A). Las mezclas a continuación se suplementaron con 2 mM Gp₄G y se prosiguió la incubación a 30°C. En (B) se representan los cromatogramas correspondientes a alícuotas tomadas 1,5 horas después de la adición del Gp₄G. Los números sobre los picos cromatográficos corresponden a los siguientes compuestos: 1, AMP; 2, pCp; 4, Ap₂Cp; 5, Ap₄A; 6, Gp₃G; 7, Gp₄G; 8, Gp₄GpCp.

tiempo se añadió a cada mezcla, Gp_4G a una concentración final de 2 mM (Fig 32B). El Gp_4GpCp formado se analizó después de 1.5 y 3 h de incubación adicional. La reacción fue lineal con el tiempo. A partir de los datos obtenidos tras 1.5 h de incubación se calculó una K_m aparente para el Ap_2Cp de aproximadamente 0.4 mM, el consumo de Ap_2Cp fue en todos los casos menor del 10%.

4.2.e Especificidad de los dinucleósido polifosfatos como aceptores de pCp

La especificidad de los distintos dinucleósido polifosfatos como aceptores de pCp se ensayó comparando en un caso dinucleósidos polifosfatos con distinta longitud de cadena y en otro dinucleósido polifosfatos con distintos tipos de base.

4.2.e.1 Polifosfatos de diguanosina con distinta longitud de cadena

Estos ensayos se llevaron a cabo incubando 0.5 mM ATP-Mg, 0.5 mM pCp , en ausencia (Fig. 33a) o presencia de 1 mM de los siguientes dinucleótidos Gp_2G (Fig 33b), Gp_3G (Fig 33c), Gp_4G (Fig 33d) o Gp_5G (Fig 33e). Las mezclas de ensayo se incubaron durante 15 h y se analizaron por HPLC. En ausencia de dinucleótido se obtuvo síntesis total de Ap_2Cp (Fig 33a, pico 4). En presencia de Gp_2G (pico 17) o Gp_3G (pico 6) no hubo consumo de Ap_2Cp (pico 4), no aumentó el AMP (pico 1) ni aparecieron los correspondientes derivados Gp_2GpCp o Gp_3GpCp , mientras que en presencia de Gp_4G (pico 7) o Gp_5G (pico 18) se obtuvo síntesis de Gp_4GpCp (pico 8) y de Gp_5GpCp (19). En presencia de Gp_4G y Gp_5G se obtuvo también una pequeña síntesis de los correspondientes derivados bis-fosfo citidililados, picos 15 y 20, respectivamente. A partir de estos resultados se puede concluir que de los polifosfatos de diguanosina ensayados, únicamente el Gp_4G y el Gp_5G reaccionan con pCp , en presencia de T4 RNA ligasa y ATP, con una eficiencia similar.

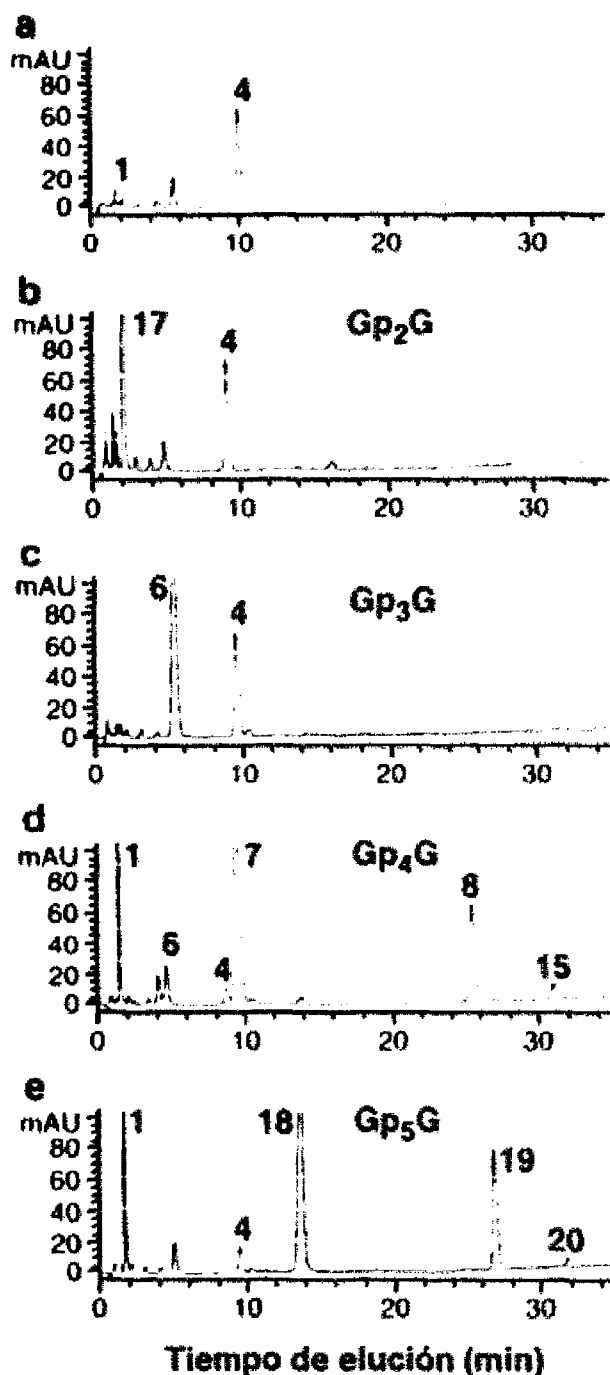


Figura 33. Especificidad de los diguanosina polifosfatos como sustratos aceptores de pCp

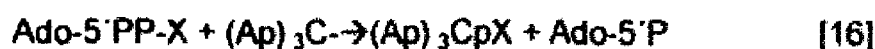
Las mezclas de ensayo (0,04 ml) contenían 0,5 mM ATP-Mg; 0,5 mM pCp; 5mM MgCl₂; 167 U/ml T4 RNA ligasa y otros componentes como se describe en Métodos. Se incubaron las mezclas en ausencia (a), o presencia (1mM) de Gp₂G, Gp₃G, Gp₄G, o Gp₅G. Tras 15 horas de incubación se tomaron alícuotas que se analizaron por HPLC (ver Materiales y métodos). Los números sobre los picos cromatográficos corresponden a los siguientes compuestos: 1, AMP; 4, Ap₂Cp; 6, Gp₃G; 7, Gp₄G; 8, Gp₄GpCp; 15, pCpGp₄GpCp; 17, Gp₂G; 18, Gp₅G; 19, Gp₅GpCp; 20, pCpGp₅GpCp.

4.2 e.2. Dinucleósidos polifosfatos con distinto tipo de base

Experimentos previos habían mostrado que el Ap_4A y el Ap_2A eran también aceptores del pCp pero con una eficiencia con respecto al Gp_4G de sólo el 30 y 14%, respectivamente. Dado que el Gp_4G era mucho mejor aceptor de pCp que el Ap_4A pareció oportuno estudiar comparativamente los dinucleótidos Gp_4G , Ap_4G , Ap_4A y Xp_4X como aceptores de pCp. Se prepararon mezclas de reacción que contenían 0.5 mM ATP-Mg, 0.5 mM pCp, 5 mM MgCl_2 y 220 U/ml de enzima y se incubaron durante 2h para preformar el Ap_2Cp ; seguidamente se añadieron a una concentración final de 1 mM los dinucleótidos arriba indicados. El análisis se hizo por HPLC tomando alícuotas de las mezclas de ensayo, después de 3, 6 y 19 h de incubación adicional. En la Fig. 34 se muestran los productos formados después de 6 h de incubación. En presencia de Gp_4G se formó el correspondiente Gp_4GpCp (Fig. 34 b, pico 8). En presencia de Ap_4A se detectó un pequeño pico correspondiente a Ap_4ApCp (Fig. 34d, pico 23), mientras que en presencia de Ap_4G se observó la formación de dos picos con idéntico espectro (Fig. 34c, picos 22 y 22'). Estos últimos picos, si bien no totalmente caracterizados deben corresponder a Ap_4GpCp (Gp_4ApCp) y Gp_4ApCp (Ap_4GpCp), respectivamente. El haber elegido el dinucleótido Xp_4X como posible aceptor de pCp se debió a que el XTP se había comportado como el mejor nucleósido trifosfato (de entre los ensayados) capaz de aceptar el AMP del complejo E-AMP para sintetizar Ap_4N en presencia de T4 RNA ligasa. Sin embargo el Xp_4X no fue aceptor de pCp, ya que no se detectaron picos adicionales a los mostrados en la Fig. 34 e, ni tampoco aumento de AMP.

4.2.f Breve resumen de otros resultados en los que se intentó ligar Gp_4G a otros compuestos

Resultados de England y col. (1977) habían mostrado que la T4 RNA ligasa catalizaba la reacción siguiente:



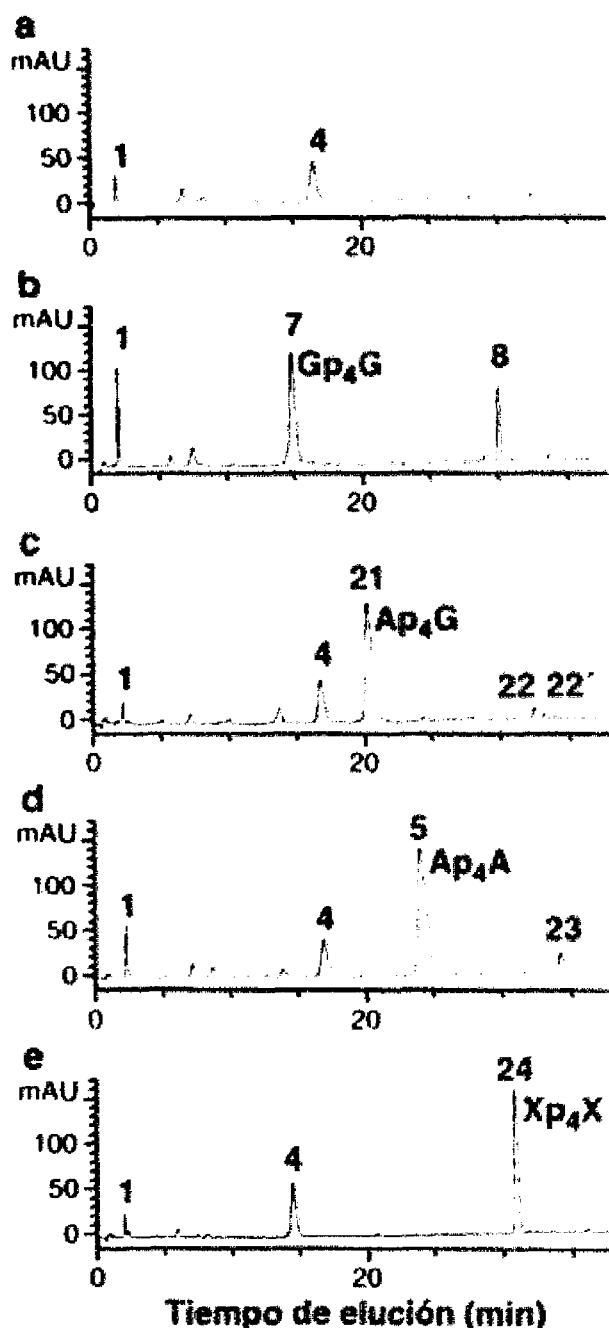


Figura 34. Especificidad de los dinucleósido tetrafosfatos como sustratos aceptores de pCp

Las mezclas de ensayo (0,03 ml) contenían 0,5mM ATP-Mg; 0,5mM pCp; 5mM $MgCl_2$; 220 U/ml T4 RNA ligasa y otros componentes como se describe en Métodos. Las mezclas se incubaron en ausencia (a), o presencia (1mM) de Gp_4G , Ap_4G , Ap_4A , o Xp_4X . Después de 6 horas de incubación se tomaron alícuotas que se analizaron por HPLC (ver Materiales y métodos). Los números sobre los picos cromatográficos corresponden a los siguientes compuestos: 1, AMP; 4, Ap_2Cp ; 5, Ap_4A ; 7, Gp_4G ; 8, Gp_4GpCp ; 21, Ap_4G ; 22 y 22', Ap_4GpCp (Gp_4ApCp) y Gp_4ApCp (Ap_4GpCp), respectivamente; 23, Ap_4ApCp ; 24, Xp_4X .

(siendo X un nucleósido (derivado de A, G, C, U dT), ribosa, nicotinamida-ribosa (Nir) o Nir reducida, etc) según la cual el residuo P-X era transferido al aceptor $(Ap)_3C$. Probamos si el Gp_4G podría substituir al $(Ap)_3C$ en la reacción [16] y dar lugar a la síntesis de los correspondientes Gp_4GpX . Para ello se incubó Gp_4G en presencia de Ap_2A ($X=A$), Ap_2Rib ($X=Rib$) y Ap_2Nir (NAD^+) ($X= Nir$), en lugar del Ap_2Cp utilizado hasta ahora. El ensayo se hizo en presencia de 0,5 mM de Ap_2X , 1 mM Gp_4G y 5 mM $MgCl_2$ y las mezclas se incubaron a 30°C durante 19 h. En ningún caso se observó síntesis del posible Gp_4GpX derivado.

También se intentó preformar Ap_2Gp y Ap_2Ap y ligar estos compuestos a Gp_4G y Ap_4A . La síntesis de estos dinucleósido pirofosfatos resultó ser 3 veces menos eficiente que la de Ap_2Cp , y una vez preformados cedían con dificultad el residuo pXp al Gp_4G o al Ap_4A . (resultados no mostrados).

5. DISCUSSION

En 1990 Guranowski y col. describieron la síntesis de dinucleósido polifosfatos catalizada por luciferasa de luciérnaga y postularon que aquellas ligasas capaces de transferir un grupo adenilo, desde un intermediario enzima-X-AMP (X=residuo ácido) serían capaces, en principio, de sintetizar dinucleósido polifosfatos. Estas ligasas catalizan generalmente, en una primera etapa, la formación de un complejo intermediario E-X-AMP con liberación de PP_i. En una segunda etapa, el residuo ácido (X) del complejo reacciona con un alcohol (Y) dando lugar a X-Y. En presencia de pirofosfatasa y en ausencia de Y, el AMP del complejo puede ser transferido a un nucleósido trifosfato (NTP) dando lugar a Ap₄N. Posteriormente Guranowski y col. (1994) y Fontes y col. (1998b,1999) observaron que otras ligasas, la acetil CoA sintetasa (EC 6.2.11) y la acil CoA sintetasa (EC6.2.1.3) eran también capaces de sintetizar (di)nucleósido polifosfatos, aunque menos eficazmente que la luciferasa.

Otras ligasas descritas capaces de formar el complejo enzima-AMP lo constituían las DNA y RNA ligasas. Estas ligasas son distintas a las aminoacil tRNA sintetisas, a la luciferasa, y a las acetil y acil sintetisas ya mencionadas, ya que forman el complejo E-AMP sin necesidad del residuo ácido X (E-X-AMP). El estudio de la posibilidad de que la DNA ligasa pudiera catalizar la síntesis de (di)nucleósido polifosfatos lo inició Olga Madrid en nuestro laboratorio (Madrid y col. 1998; Madrid, 1999) y casi en paralelo se empezaron a estudiar las características de la reacción de síntesis de (di)nucleósido polifosfatos catalizada por la T4 RNA ligasa. Los resultados más relevantes obtenidos con esta enzima, recogidos en esta tesis y en Atencia y col. (1999, 2000) se resumen a continuación.

Se pudo demostrar, que en ausencia de RNA, el complejo E-AMP formado en presencia de T4 RNA ligasa y ATP (Fig. 2) disminuía a medida que aumentaba la concentración de P₃ en el medio de ensayo, lo que se puede interpretar como la acción en reverso de la reacción [13]: $ATP + E \leftrightarrow E-AMP + PP_i$, en donde el P₃ ocupa el lugar del PP_i en la reacción en reverso y libera E y p₄A. También se estudió la transferencia del AMP del complejo E-AMP a otros compuestos. En las Fig. 3 y 4 se muestra la síntesis de Ap₄A, la activación

ejercida por la adición de pirofosfatasa al medio de ensayo, y la caracterización del dinucleótido formado.

Las condiciones óptimas encontradas para la reacción de síntesis de (di)nucleótidos fueron las siguientes: presencia de pirofosfatasa, 5 mM de Mg^{2+} libre, pH óptimo alrededor de 7,4 y concentraciones del nucleótido o tripolifosfato aceptor del orden mM.

La capacidad relativa de distintos nucleótidos de formar el complejo E-NMP se analizó indirectamente estudiando su capacidad de sintetizar p_4N en presencia de P_3 y resultó ser: ATP (100), dATP (6), CTP=GTP (>1).

La capacidad de distintos nucleótidos de ser aceptores del AMP del complejo E-AMP se estudió utilizando condiciones en las que la concentración de ATP en el medio era baja, para minimizar así la síntesis de Ap_4A y las concentraciones de P_3 o NTPs elevadas (4 mM). El resultado obtenido fue el siguiente: p_4N (200); Ap_4X (100); Ap_4dG (74); Ap_4G (49); Ap_4dC (23); Ap_4C (9); Ap_3A (5); Ap_4ddA (1). La identidad de estos dinucleótidos se estableció por su insensibilidad a la fosfatasa alcalina, por su posición cromatográfica y por su espectro de absorción (Fig. 12).

El ATP γ S ha sido ampliamente utilizado en nuestro laboratorio para la síntesis específica de Ap_4Ns catalizada por la luciferasa por ser un buen donador del grupo adenilo para formar el complejo E-AMP pero ser un mal aceptor del mismo. Al utilizar este compuesto para la síntesis específica de $Ap_{4(3)}N$ con T4 RNA ligasa se encontró que el rendimiento obtenido era solo de un 10-25% del que se lograba utilizando ATP. (Fig. 13, 14).

La síntesis de (di)nucleótidos tiene lugar en ausencia de donadores (p-5'-RNA) o aceptores (HO-3'-RNA) de RNA. Según la reacción [14] sería de esperar que compuestos del tipo p-5'-RNA fueran inhibidores de la reacción de síntesis de dinucleótidos ya que tanto los NTPs como los p-5'-RNA compiten por el mismo complejo E-AMP. Así, los ribonucleótidos 5',3',(2')-bisfosfatos, pCp, pAp y pA2'p, compuestos capaces de reaccionar con el complejo E-AMP para formar los correspondientes derivados $AppC(A)p$ resultaron potentes

inhibidores de la síntesis de Ap_4A (Figs. 21 y 22). El grado de inhibición encontrada fue similar a su conocida capacidad de actuar como *donadores* en la reacción de ligación de RNA como consecuencia de la mayor facilidad para formar el correspondiente $AppC(A)p$. Por el contrario, un compuesto *aceptor* como por ejemplo el poli (A) desfosforilado, que no compete con los NTPs por el complejo E-AMP, no fue inhibidor de la síntesis de dinucleósido polifosfatos

Resultados previos habían mostrado que dinucleósido polifosfatos del tipo (Np_nN) se comportaban como aceptores en las reacciones catalizadas por las siguientes polimerasas: RNA polimerasa (Konarska & col. 1984), DNA polimerasa (Zamecnik & col. 1982), $(2'.5')$ oligo(A) polimerasa (Minks & col. 1980) y poli (ADP-ribosa) polimerasa (Yoshihara & Tanaka (1981), Sillero & Cameselle, 1992 y Kisselev & col. 1998). Con estos antecedentes y analizando la reacción [15]



Parecía probable que los dinucleótidos polifosfatos, moléculas que contienen en su estructura dos grupos $3'\text{-}OH$ libres pudieran reaccionar con E-AppRNA para dar lugar a $Np_nNpC(A)p$ o $pC(A)Np_nNpC(A)p$. Resultados previos habían mostrado que los substratos de menor tamaño capaces de ser adenilados por el complejo E-AMP, en la reacción catalizada por la T4 RNA ligasa, eran los ribonucleósidos $3'(2')\text{-}5'$ bisfosfatos (pCp , pAp , $pA2'p$) (Cranston & col. 1974), mientras que el substrato de menor tamaño capaz de actuar como *aceptor* en la reacción de ligación [16] era un trinucleótido difosfato ($NpNpN$) (Uhlenbeck & Gumport, 1982) y se consideró improbable que estructuras de tipo *cap* (derivados metilados del Gp_3G) pudieran ser substratos de la T4 RNA ligasa (England y Uhlenbeck, 1978).

En este trabajo se muestra, por vez primera, que ciertos dinucleósido polifosfatos son capaces de actuar también como RNA *aceptores* utilizando pCp como RNA *donador* dando lugar a Gp_4GpCp (Fig. 23) y en menor proporción $pCpGp_4GpCp$ (Fig. 25). La caracterización de estos compuestos se

llevó a cabo sintetizando y aislando el correspondiente derivado (Fig. 24) y analizando los productos generados después de tratar con fosfatasa alcalina y/o fosfodiesterasa y analizando su comportamiento cromatográfico (Fig. 25), su coelución con patrones y sus espectros de absorción. Estos últimos han sido fundamentales ya que permiten distinguir fácilmente los compuestos que contienen en su molécula sólo G, 1G+1C, 1G + 2C y sólo C (Fig. 26).

Para establecer las condiciones óptimas para la síntesis de Gp_4GpCp se ha estudiado la dependencia de la reacción de la concentración de los substratos: Gp_4G y Ap_2Cp . Para estudiar el efecto de la concentración de Gp_4G , se utilizaron distintas mezclas en las que se había preformado Ap_2Cp , y a las que se agregaron concentraciones crecientes de Gp_4G (Fig. 31). En estas condiciones se obtuvo un valor de K_m aparente para el Gp_4G de 4 mM. Para analizar la dependencia de Ap_2Cp , se prepararon distintas mezclas en las que se preformaron cantidades variables de este substrato y posteriormente se incubaron en presencia de una concentración fija de Gp_4G (Fig. 32). El valor K_m aparente determinado para el Ap_2Cp fue de aproximadamente 0.4 mM. Estos valores son muy similares a los obtenidos por Hinton y col. (1978) cuando utilizaron el $pdTp$ y el $dA(pdA)_4$ como substrato donador y aceptor respectivamente.

Al estudiar la especificidad de distintos dinucleósido polifosfatos como aceptores de pCp se encontró que la T4 RNA ligasa es capaz de discriminar entre compuestos que contienen el mismo número de fosfatos internos pero distinta base como es el caso de Gp_4G , Ap_4G , Ap_4A y Xp_4X (Fig. 34) y entre homodinucleótidos que contienen una cadena interna de fosfatos de distinta longitud tales como Gp_2G , Gp_3G , Gp_4G y Gp_5G (Fig. 33). Según estos resultados se puede concluir que la T4 RNA ligasa prefiere los dinucleótidos de guanina a los de adenina o xantina, y que requiere que la cadena interna de fosfatos tenga un mínimo de 4 fosfato. Esta especificidad de substrato es más estricta que la mostrada por las dos enzimas que hidrolizan específicamente dinucleósido polifosfatos: la dinucleósido trifosfatasa (Sillero & col. 1977; Guranowski & Sillero, 1992) y la dinucleósido tetrafosfatasa (Lobatón & col. 1975; Guranowski

& Sillero, 1992). enzimas que reconocen específicamente dinucleósidos tri o tetrafosfatos, respectivamente, independientemente del tipo de base (a excepción de la xantina en el caso de la trifosfatasa)

La base molecular que hace que la T4 RNA ligasa sea capaz de distinguir Gp_4G de Gp_3G y Gp_4A no se conoce, así como tampoco la función de la enzima. No se puede descartar que los dinucleósido polifosfatos pudieran jugar un papel en el ciclo celular del fago T4 a través de la T4 RNA ligasa. Se sabe que mutaciones en el gen 63 del fago T4 que codifica la T4 RNA ligasa dan lugar a un fallo en la unión no covalente de las fibras de la cola del fago originando partículas de T4 sin fibras (Runnels & col. 1982). Durante el proceso de morfogénesis del fago, la T4 RNA ligasa podría reconocer ciertas estructuras de las proteínas del fago parecidas a las estructuras Gp_4G/Gp_5G .

6. CONCLUSIONES

1. La T4 RNA ligasa (EC 6.5.1.3) cataliza la síntesis de (di)nucleósido polifosfatos según el siguiente mecanismo de reacción en la primera etapa se forma el complejo E-AMP, y en una segunda etapa el AMP del complejo es cedido a un NTP o P₃ para dar lugar a Ap₄N o p₄A

2. La especificidad de nucleótido para formar el complejo E-NMP resultó ser de: 100 (ATP); 6 (dATP) y CTP=GTP (>1).

3. La síntesis de (di)nucleótidos catalizada por la T4 RNA ligasa es estimulada por pirofosfatasa, depende de catión divalente (Mg²⁺ y Mn²⁺), el valor de pH óptimo de la reacción es 7,4 y la K_m aparente para el nucleótido aceptor es del orden mM. Utilizando estas condiciones y una concentración de nucleótido aceptor de 4 mM la síntesis relativa de (di)nucleótidos polifosfatos fue la siguiente: p₄N (200); Ap₄X (100); Ap₄dG (74); Ap₄G (49); Ap₄dC (23); Ap₄C (9); Ap₃A (5); Ap₄ddA (1).

4. Esta reacción de síntesis es inhibida por (NH₄)₂SO₄ (IC₅₀=30 mM), por Na⁺ y K⁺ (IC₅₀=150 mM); por Zn²⁺ (IC₅₀=10 μM), por el polifosfato P₄₅ (IC₅₀=100 μM) y por ribonucleósidos 3'(2')-5'- bisfosfatos (pCp, pAp, pA2'p). Estos últimos compuestos compiten con los NTPs por el AMP del complejo E-AMP y dan lugar a Ap₂C(A)p.

5. La T4 RNA ligasa puede utilizar dinucleósido polifosfatos como aceptores del pCp. El Ap₂Cp que se forma en presencia de ATP y pCp reacciona con los grupos 3'-OH libres del Gp₄G generando Gp₄GpCp y en menor proporción pCpGp₄GpCp. Para la síntesis de Gp₄GpCp se determinaron unos valores de K_m aparentes para los sustratos Gp₄G y Ap₂Cp de 4 y 0,4 mM, respectivamente.

6. La T4 RNA ligasa es capaz de discriminar entre dinucleótidos que contienen el mismo número de fosfatos internos pero difieren en la base, y homodinucleótidos con distinto número de fosfatos. El enzima prefiere dinucleótidos de guanina a adenina o xantina y requiere un mínimo de 4 fosfatos en la cadena interna.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Abend, A., Garrison, P. N., Barnes, L.D. & Frey, P. A. (1999) Stereochemical retention of the configuration in the action of fhl1 on phosphorus-chiral substrates. *Biochemistry* 38: 3668-3676.
- Abeygunawardana, C., Weber, D.J., Gittis, A.G., Frick, D.N., Lin, J., Miller, A.F., Bessman, M.J. & Mildvan, A.S. (1995) Solution structure of the MutT enzyme, a nucleoside triphosphate pyrophosphohydrolase. *Biochemistry* 34: 14997-15005.
- Atencia, E. A., Madrid, O., Sillero, M.A.G. & Sillero, A. (1999) T4 RNA ligase catalyzes the synthesis of dinucleoside polyphosphates. *Eur. J. Biochem.* 261, 802-811.
- Atencia, E. A., Montes, M., Sillero, M.A.G. & Sillero, A. (2000) Several dinucleoside polyphosphates are acceptor substrates in the T4 RNA ligase catalyzed reaction. *Eur. J. Biochem.* 267, 1707-1714.
- Bairoch, A. (1999) The enzyme data bank in 1999. *Nucleic Acids Res.* 27: 310-11.
- Bartkiewicz, M., Sierakowska, H. & Shugar, D. (1984) Nucleotide pyrophosphatase from potato tubers: purification and properties. *Eur. J. Biochem.* 143: 419-426.
- Barnes, L.D. & Culver, C.A. (1982) Isolation and characterization of diadenosine 5',5'''-P¹,P⁴-tetraphosphate pyrophosphohydrolase from *Physarum polycephalum*. *Biochemistry* 21: 6123-6128.
- Barnes, L.D., Garrison, P.N., Siprashvili, Z., Guranowski, A., Robinson, A.K., Ingram, S. W., Croce, C.M., Ohta, M. & Huebner, K. (1996) Fhl1, a putative tumor suppressor in humans, is a dinucleoside 5',5'''-P¹,P³-triphosphate hydrolase. *Biochemistry* 35: 11529-11535.
- Bessman, M.J., Frick, D.N. & O'Handley, S.F. (1996) The MutT proteins or "Nudix" hydrolases, a family of versatile, widely distributed, "Housecleaning" enzymes. *J. Biol. Chem.* 271: 25059-25062.
- Bo, X., Fischer, B., Maillard, M., Jacobson, K.A. & Burnstock, G. (1994) Comparative studies on the affinities of ATP derivatives for P_{2U} purinoreceptors in rat urinary bladder. *Br. J. Pharmacol.* 112: 1151-1159.
- Bochner, B.R., Lee, P.C., Wilson, S.W., Cutler, C.W. & Ames, B.N. (1984) AppppA and related adenylylated nucleotides are synthesized as a consequence of oxidation stress. *Cell* 37: 225-232.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Brennan, C.A., Manthey, A.E. & Gumport, R.I. (1983) Using T4 RNA ligase with DNA substrates. *Methods Enzymol.* 100: 38-52.
- Brenner, Ch., Garrison, P., Gilmour, J., Peisach, D., Ringe, D., Petsko, G.A. & Lowenstein, J.M. (1997) Crystal structures of HINT demonstrate that histidine triad proteins are GalT-related nucleotide-binding proteins. *Nat. Struct. Biol.* 4: 231-238.
- Brevet, A., Chen, J., Léveque, F., Plateau, P. & Blanquet, S. (1989) *In vivo* synthesis of adenylylated bis(5'-nucleosidyl) tetraphosphates (Ap₄N) by *Escherichia coli* aminoacyl-tRNA synthetases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 8275-8279.

- Brevet, A., Chen, J., Fromant, M., Blanquet, S. & Plateau, P. (1991) Isolation and characterization of a dinucleoside triphosphatase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 173: 5275-5279.
- Busshardt, E., Gerok, W. & Häussinger, D. (1989) Regulation of hepatic parenchymal and non-parenchymal cell function by the diadenine nucleotides Ap_3A and Ap_4A . *Biochim. Biophys. Acta* 1010: 151-159.
- Cameselle, J. C., Costas, M.J., Günther Sillero, M.A. & Sillero, A. (1984) Two low K_m hydrolytic activities on dinucleoside 5',5'''- P^1, P^4 -tetraphosphates in rat liver. *J. Biol. Chem.* 259: 2879-2885.
- Cartwright, J.L. & McLennan, A.G. (1999a) The *Saccharomyces cerevisiae* YOR163w gene encodes a diadenosine 5',5'''- P^1, P^6 -hexaphosphate (Ap_6A) hydrolase member of the MutT motif (Nudix hydrolase) family. *J. Biol. Chem.* 274: 8604-8610.
- Cartwright, J.L. & McLennan, A.G. (1999b) Formation of a covalent NH_2 -guanylylhistidyl reaction intermediate by the GTP:GTP guanylyltransferase from the brine shrimp *Artemia*. *Arch. Biochem. Biophys.* 361: 101-105.
- Cartwright, J.L., Britton, P., Minnick, M.F. & McLennan, A. G. (1999) The *ialA* invasion gene of *Bartonella bacilliformis* encodes a (di)nucleoside polyphosphate hydrolase of the MutT motif family and has homologs in other invasive bacteria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 256: 474-479.
- Chao, F.C. & Zamecnik, P. (1984) Inhibition of platelet aggregation by Ap_4A . *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem.* 365: 610.
- Chen, J., Brevet, A., Blanquet, S., & Plateau, P. (1998) Control of 5',5'-dinucleoside triphosphate catabolism by *APH1*, a *Saccharomyces cerevisiae* analog of human *FIHT*. *J. Bacteriol.* 180: 2345-2349.
- Churin, J., Hause, B., Feussner, I., Maucher, H.P., Feussner, K., Börner, T. & Wasternack, C. (1998) Cloning and expression of a new cDNA from monocotyledonous plants coding for a diadenosine 5',5'''- P^1, P^4 -tetraphosphate hydrolase from barley (*Hordeum vulgare*). *FEBS Lett.* 431: 481-485.
- Conyers, G. B. & Bessman, M. J. (1999) The gene, *ialA*, associated with the invasion of human erythrocytes by *Bartonella bacilliformis*, designates a nudix hydrolase active on dinucleoside 5'-polyphosphates. *J. Biol. Chem.* 274: 1203-1206.
- Craik, K.M., McLennan, A.G. & Fisher, M. I. (1993) Adenine dinucleotide-mediated activation of glycogen phosphorylase in isolated liver cells. *Cell. Signal* 5: 89-96.
- Cranston, J.W., Silber, R., Malathi, V.G. & Hurwitz, J. (1974) Studies on ribonucleic acid ligase. Characterization of an adenosine triphosphate-inorganic pyrophosphate exchange reaction and demonstration of an enzyme-adenylate complex with T4 bacteriophage-induced enzyme. *J. Biol. Chem.* 249: 7447-7456.
- De Wet, J.R., Wood, K.V., DeLuca, M., Helinski, D.R. & Subramani, S. (1987) Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* 7: 725-737.
- Delaney, S.M., Blackburn, G.M. & Geiger, J.D. (1997) Diadenosine polyphosphates inhibit adenosine kinase activity but decrease levels of endogenous adenosine in rat brain. *Eur. J. Pharmacol.* 332: 35-42.

- Dukhovich, A., Sillero, A. & Günther Sillero, M.A. (1996) Time course of luciferyl adenylate synthesis in the firefly luciferase reaction. *FEBS Lett.* 395: 188-190.
- Edgecombe, M., McLennan, A.G. & Fisher, M.J. (1996) Characterization of the binding of diadenosine 5',5'''-P¹,P⁴-tetrphosphate (Ap₄A) to rat liver cell membranes. *Biochem. J.* 314: 687-693.
- England, T. E. & Uhlenbeck, O. C. (1978) Enzymatic oligoribonucleotide synthesis with T4 RNA ligase. *Biochemistry* 17: 2069-2076.
- England, T. E., Gumport, R. I. & Uhlenbeck, O. C. (1977) Dinucleoside pyrophosphates are substrates for T4-induced RNA ligase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 4839-4842.
- Fairbanks, G., Steck, T. L. & Wallach, D. F. H. (1971) Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry* 10: 2606-2617.
- Farr, S.B., Arnosti, D.N., Chamberlin, M.J. & Ames, B.N. (1989) An *apaH* mutation causes AppppA to accumulate and affects motility and catabolite repression in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 5010-5014.
- Fernández, A., Costas, M.J., Günther Sillero, M.A. & Sillero, A. (1984) Diadenosine tetrphosphate activates AMP deaminase from rat muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 121: 155-161.
- Fernley, H.N. (1971) Mammalian alkaline phosphatases. *The Enzymes* 4: 417-447.
- Finamore, F. J. & Warner, A.H. (1963). The occurrence of P¹,P⁴-diguanosine 5'-tetrphosphate in brine shrimp eggs. *J. Biol. Chem.* 238: 344-348.
- Flodgaard, H. & Klenow, H. (1982) Abundant amounts of diadenosine 5',5'''-P¹,P⁴-tetrphosphate are present and releasable, but metabolically inactive, in human platelets. *Biochem. J.* 208: 737-742.
- Fontes, R., Dukhovich, A., Sillero, A. & Günther Sillero, M.A. (1997) Synthesis of dehydroluciferin by firefly luciferase: effect of dehydroluciferin, coenzyme A and nucleoside triphosphates on the luminescent reaction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 237: 445-450.
- Fontes, R., Ortiz, B., de Diego, A., Sillero, A. & Günther Sillero, M.A. (1998a) Dehydroluciferyl-AMP is the main intermediate in the luciferin dependent synthesis of Ap₄A catalyzed by firefly luciferase. *FEBS Lett.* 438: 190-194.
- Fontes, R., Günther Sillero, M.A. & Sillero, A. (1998b) Acyl Coenzyme A synthetase from *Pseudomonas fragi* catalyzes the synthesis of adenosine 5'-polyphosphates and dinucleoside polyphosphates. *J. Bacteriol.* 180: 3152-3158.
- Fontes, R., Günther Sillero, M.A. & Sillero, A. (1999) Acyl-CoA synthetase catalyzes the synthesis of diadenosine hexaphosphate (Ap₆A). *Biochimie* 81: 1-6.
- Frick, D. N. & Bessman, M. J. (1995) Cloning, purification, and properties of a novel NADH pyrophosphatase. *J. Biol. Chem.* 270: 1529-1534.
- Garrison, P. N. & Barnes, L. D. (1992) Determination of dinucleoside polyphosphates. En : Ap₄A and other dinucleoside polyphosphates, pp.29-61, McLennan, A.G. (ed) CRC Press, Boca Raton, Fl.
- Gasmi, L., Cartwright, J.L. & McLennan, A.G. (1998) The hydrolytic activity of bovine adrenal medullary plasma membranes towards diadenosine

- polyphosphates is due to alkaline phosphodiesterase-I. *Biochim. Biophys. Acta* 1405: 121-127.
- Guranowski, A. & Blanquet, S. (1985) Phosphorolytic cleavage of diadenosine 5',5'''-P¹,P⁴-tetraphosphate. Properties of homogeneous diadenosine 5',5'''-P¹,P⁴-tetraphosphate α,β -phosphorylase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 260: 3542-3547.
- Guranowski, A. & Blanquet, S. (1986) Diadenosine 5',5'''-P¹,P⁴- α,β -phosphorylase from yeast supports nucleoside diphosphate-phosphate exchange. *J. Biol. Chem.* 261: 5943-5946.
- Guranowski, A. & Robinson, A. K. (1996) Adenosine tetraphosphatase activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *FASEB J.* 10: 1105.
- Guranowski, A. & Sillero, A. (1992) En: Ap₄A and other dinucleoside polyphosphates, pp.81-133, McLennan, A.G. (ed) CRC Press, Boca Raton, FL.
- Guranowski, A., Jakubowski, H., & Holler, E. (1983) Catabolism of diadenosine 5',5'''-P¹,P⁴-tetraphosphate in procaryotes: purification and properties of diadenosine 5',5'''-P¹,P⁴-tetraphosphate (*symmetrical*) pyrophosphohydrolase from *Escherichia coli* K12. *J. Biol. Chem.* 258: 14784-14789.
- Guranowski, A., Günther Sillero, M.A. & Sillero, A. (1990) Firefly luciferase synthesizes P¹,P⁴-bis(5'-adenosyl)tetraphosphate (Ap₄A) and other dinucleoside polyphosphates. *FEBS Lett.* 271: 215-218.
- Guranowski, A., Starzynska, E., Rataj-Guranowska, M. & Günther Sillero, M.A. (1991) Purification of apyrase from yellow lupin cotyledons after extraction with perchloric acid. *Protein Expression Purif.* 2: 235-239.
- Guranowski, A., Günther Sillero, M.A. & Sillero, A. (1994) Adenosine 5'-tetraphosphate and adenosine 5'-pentaphosphate are synthesized by yeast acetyl coenzyme A synthetase. *J. Bacteriol.* 176: 2986-2990.
- Guranowski, A., Starzynska, E., Brown, P. & Blackburn, G.M. (1997) Adenosine 5'-tetraphosphate phosphohydrolase from yellow lupin seeds: purification to homogeneity and some properties. *Biochem. J.* 328: 257-262.
- Guranowski, A., Starzynska, E., Barnes, L.D., Robinson, A.K. & Liu, S. (1998) Adenosine 5'-tetraphosphate phosphohydrolase activity is an inherent property of soluble exopolyphosphatase from yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* 1380: 232-238.
- Hankin, S., Wintero, A. K. & McLennan, A. G. (1997) Molecular cloning of diadenosine tetraphosphatase from pig small intestinal mucosa and identification of sequence blocks common to diadenosine polyphosphate hydrolases and phosphorylases. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 29: 317-323.
- Harnett, S.P., Lowe, G. & Tansley, G. (1985) A stereochemical study of the mechanism of activation of donor oligonucleotides by RNA ligase from bacteriophage T4 infected *Escherichia coli*. *Biochemistry* 24: 7446-7449.
- Heidenreich, S., Tepel, M., Schlüter, H., Harrach, B. & Zidek, W. (1995) Regulation of rat mesangial cell growth by diadenosine phosphates. *J. Clin. Invest.* 95: 2862-2867.
- Hilderman, R. H., Martin, M., Zimmerman, J. K. & Pivorun, E. B. (1991) Identification of a unique membrane receptor for adenosine 5',5'''-P¹,P⁴-tetraphosphate. *J. Biol. Chem.* 266: 6915-6918.

- Hilderman, R. H., Lilien, J. E., Zimmerman, J. K., Tate, D. H., Dimmick, M. A. & Jones, G. B. (1994) Adenylated dinucleotide binding to the adenosine 5',5'''-P¹,P⁴-tetraphosphate mouse heart receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 200, 749-755.
- Hinton, D. M., Baez, J. A. & Gumpert, R. I. (1978) T4 RNA ligase joins 2'-deoxyribonucleoside 3',5'-bisphosphates to oligodeoxyribonucleotides. *Biochemistry*, 17, 5091-5097.
- Hollander, V. P. (1971) Acid phosphatases. *The Enzymes* 4, 449-498.
- Holler, E. (1992) The chemistry of dinucleoside polyphosphates. En: *Ap₄A and other dinucleoside polyphosphates*, pp 9-28, McLennan, A. G. (ed) CRC Press, Boca Raton, FL.
- Hoyle, C. H. V. (1990) Pharmacological activity of adenine dinucleotides in the periphery: possible receptor classes and transmitter function. *Gen. Pharmacol.* 21: 827-831.
- Huang, Y., Garrison, P. N. & Barnes, L. D. (1995) Cloning of the *Schizosaccharomyces pombe* gene encoding diadenosine 5',5'''-P¹,P⁴-tetraphosphate (Ap₄A) asymmetrical hydrolase: sequence similarity with the histidine triad (HIT) protein family. *Biochem. J.* 312: 925-932.
- Hurtado, C., Ruiz, A., Sillero, A. & Sillero, M. A. G. (1987) Specific magnesium-dependent didenosine 5',5'''-P¹,P³-triphosphate pyrophosphohydrolase in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 169, 1718-1723.
- Huebner, K., Garrison, P. N., Barnes, L. D. & Croce, C. M. (1998) The role of the *FHIT/FRA3B* locus in cancer. *Annu. Rev. Genet.* 32: 7-31.
- Ingram, S. W., Stratemann, S. A., & Barnes, L. D. (1999) *Schizosaccharomyces pombe* Aps1, a diadenosine 5',5'''-P¹,P⁶-hexaphosphate hydrolase that is a member of the Nudix (MutT) family of hydrolases: cloning of the gene and characterization of the purified enzyme. *Biochemistry* 38: 3649-3655.
- Itoh, R. & Yamada, K. (1990) Pig lung 5'-nucleotidase: effect of diadenosine 5',5'''-P¹,P⁴-tetraphosphate and its related compounds. *Int. J. Biochem.* 22: 231-238.
- Jakubowski, H. (1986) Sporulation of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is accompanied by synthesis of adenosine 5'-tetraphosphate and adenosine 5'-pentaphosphate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 2378-2382.
- Jakubowski, H. & Guranowski, A. (1983) Enzymes hydrolyzing ApppA and/or AppppA in higher plants: purification and some properties of diadenosine triphosphatase, diadenosine tetraphosphatase, and phosphodiesterase from yellow lupin (*Lupinus luteus*) seeds. *J. Biol. Chem.* 258: 9982-9989.
- Jankowski, J., Potthoff, W., van der Giet, M., Tepel, M., Zidek, W. & Schlüter, H. (1999a) High-performance liquid chromatographic assay of diadenosine polyphosphates in human platelets. *Anal. Biochem.* 269: 72-78.
- Jankowski, J., Tepel, M., van der Giet, M., Tente, I. M., Henning, L., Junker, R., Zidek, W. & Schlüter, H. (1999b) Identification and characterization of P¹,P⁷-(di)adenosine-5')-heptaphosphate from human platelets. *J. Biol. Chem.* 274: 23926-23931.
- Kaufmann, G. & Kallenbach, N. R. (1975) Determination of recognition sites of T4 RNA ligase on the 3'-OH and 5'-P termini of polyribonucleotide chains. *Nature* 254, 452-454.

- Keppens, S. (1996) Effects of diadenosine triphosphate and diadenosine tetraphosphate on rat liver cells. Differences and similarities with ADP and ATP. *Biochem. Pharmacol.* 52: 441-445.
- Kikuchi, Y., Hishinuma, F. & Sakaguchi, K. (1978) Addition of mononucleotides to oligoribonucleotides acceptors with T4 RNA ligase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 1270-1273.
- Kikuta, Y., Sekine, A., Tezuka, S., Okada, K., Yamaura, T. & Nakajima, H. (1994) Intravenous diadenosine tetraphosphate in dogs: cardiovascular effects and influence on blood gases. *Acta Anaesthesiol. Scand.* 38: 284-288.
- Kikuta, Y., Ohiwa, E., Okada, K., Watanabe, A. & Haruki, S. (1999) Clinical application of diadenosine tetraphosphate (Ap₄A-F-1500) for controlled hypotension. *Acta Anaesthesiol. Scand.* 43: 82-86.
- Kisselev, L.L., Justesen, J., Wolfson, A.D. & Frolova, L.Y. (1998) Diadenosine oligophosphates (Ap_nA), a novel class of signalling molecules? *FEBS Lett.* 427: 157-163.
- Knopf, K-W. (1977) Simple isolation method and assay for T4 DNA ligase and characterization of the purified enzyme. *Eur. J. Biochem.* 73: 33-38.
- Konarska, M. M., Padgett, R. A. & Sharp, P. A. (1984) Recognition of cap structure in splicing *in vitro* of mRNA precursors. *Cell*, 38: 731-736.
- Koonin, E.V. (1993) A highly conserved sequence motif defining the family of MutT-related proteins from eubacteria, eukaryotes and viruses. *Nucleic Acids Res.* 21: 4847.
- Kornberg, A. & Baker, T. A. (1992) DNA Replication, 2^a edición. WH Freeman, New York.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lavie, A., Konrad, M., Brundiers, R., Goody, R.S., Schlichting, I. & Reinstein, J. (1998) Crystal structure of yeast thymidylate kinase complexed with the bisubstrate inhibitor (P¹-(5'-adenosyl) P⁵-(5'-(thymidyl)pentaphosphate (TP₅A) at a 2.0 Å-Resolution: implications for catalysis and AZT activation. *Biochemistry* 37: 3677-3686.
- Lee, P.C., Bochner, B.R. & Ames, B.N. (1983a) Diadenosine 5',5'''-P¹,P⁴-tetraphosphate and related adenylylated nucleotides in *Salmonella typhimurium*. *J. Biol. Chem.* 258: 6827-6834.
- Lee, P.C., Bochner, B.R. & Ames, B.N. (1983b) AppppA, heat-shock stress, and cell oxidation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 7496-7500.
- Lee, J.W., Jeon, S.J., Kong, I.D. & Jeong, S.W. (1995) Identification of adenosine 5'-tetraphosphate in rabbit platelets and its metabolism in blood. *Kor. J. Physiol.* 29: 217-223.
- Lieberman, I. (1955) Identification of adenosine tetraphosphate from horse muscle. *J. Am. Chem. Soc.* 77: 3373-3375.
- Lehman, I.R. (1974) DNA ligase: structure, mechanism, and function. The joining of DNA chains by DNA ligase is an essential component of DNA repair, replication, and recombination. *Science* 186: 790-797.
- Lienhard, G.E. & Secemski, I.I. (1973) P¹,P⁵-di(adenosine-5')pentaphosphate, a potent multisubstrate inhibitor of adenylylate kinase. *J. Biol. Chem.* 248: 1121-1123.
- Lindahl, T. & Barnes, D.E. (1992) Mammalian DNA ligases. *Annu. Rev. Biochem.* 61: 251-281.

- Liu, J.J. & McLennan, A.G. (1994) Purification and properties of GTP GTP guanylyltransferase from encysted embryos of the brine shrimp *Artemia*. *J. Biol. Chem.* 269: 11787-11794.
- Lobatón, C.D., Vallejo, C.G., Sillero, A. & Sillero, M. A. G. (1975) Diguanosinetetraphosphatase from rat liver: activity on diadenosine tetraphosphate and inhibition by adenosine tetraphosphate. *Eur. J. Biochem.* 50: 495-501.
- Luo, J., Jankowski, J., Knobloch, M., Van der Giet, M., Gardanis, K., Russ, T., Vahlensieck, U., Neumann, J., Schmitz, W., Tepel, M., Deng, M.C., Zidek, W. & Schlüter, H. (1999) Identification and characterization of diadenosine 5',5'''-P¹,P²-diphosphate and diadenosine 5',5'''-P¹,P³-triphosphate in human myocardial tissue. *FASEB J.* 13: 695-705.
- Luthje, J. & Ogilvie, A. (1983) The presence of diadenosine 5',5'''-P¹,P³-triphosphate (Ap₃A) in human platelets. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 115: 253-260.
- Luthje, J. & Ogilvie, A. (1985) Catabolism of Ap₃A and Ap₄A in human plasma. Purification and characterization of a glycoprotein complex with 5'-nucleotide phosphodiesterase activity. *Eur. J. Biochem.* 149: 119-127.
- Madrid, O. (1999) Síntesis de di-2',3'-dideoxinucleósidos polifosfatos catalizada por luciferasa de luciérnaga y T4 DNA ligasa. Exploración del metabolismo de los (2',3'-dideoxi) nucleótidos. Universidad Autónoma de Madrid.
- Madrid, O., Martín, D., Alencia, E.A., Sillero, A. & Günther Sillero, M.A. (1998) T4 DNA ligase synthesizes dinucleoside polyphosphates. *FEBS Lett.* 433: 283-286.
- Maksel, D., Guranowski, A., Ilgoutz, S.C., Moir, A., Blackburn, G.M. & Gayler, K.R. (1998) Cloning and expression of diadenosine 5',5'''-P¹,P⁴-tetraphosphate hydrolase from *Lupinus angustifolius* L. *Biochem. J.* 329: 313-319.
- Marques, A.F.P., Teixeira, N.A., Gambaretto, C., Sillero, A. & Günther Sillero, M.A. (1998) IMP-GMP 5'-nucleotidase from rat brain: activation by polyphosphates. *J. Neurochem.* 71: 1241-1250.
- Marrian, D.H. (1954) A new adenine nucleotide. *Biochim. Biophys. Acta* 13: 278-281.
- McElroy, W.D., DeLuca, M. & Travis, J. Molecular uniformity in biological catalyses. The enzymes concerned with firefly luciferin, amino acid, and fatty acid utilization are compared. (1967) *Science* 157: 150-160.
- McElroy, W.D., Seliger, H.H. & White, E.H. (1969) Mechanism of bioluminescence, chemiluminescence and enzyme function in the oxidation of firefly luciferin. *Photochem. Photobiol.* 10: 153-170.
- McLennan, A.G., Mayers, E. & Adams, D.G. (1996) *Anabaena flos-aquae* and other cyanobacteria possess diadenosine 5',5'''-P¹,P⁴-tetraphosphate (Ap₄A) phosphohydrolase activity. *Biochem. J.* 320: 795-800.
- McLennan, A.G., Mayers, E., Hankin, S., Thorne, N.M.H., Prescott, M. & Powls, R. (1994) The green alga *Scenedesmus obliquus* contains both diadenosine 5',5'''-P¹,P⁴-tetraphosphate (asymmetrical) pyrophosphohydrolase and phosphorylase activities. *Biochem. J.* 300: 183-189.
- Miller, D. & McLennan, A.G. (1986) Changes in intracellular levels of Ap₃A and Ap₄A in cysts and larvae of *Artemia* do not correlate with changes in protein synthesis after heat-shock. *Nucleic Acids Res.* 14: 6031-6040.

- Minks, M. A., Benveniste, S. & Baglioni, C. (1980) Mechanism of pppA(2'p5'A)_n2'p5'A_{OH} synthesis in extracts of interferon-treated HeLa cells. *J. Biol. Chem.* 255, 5031-5035.
- Nishimura, A. (1998) The timing of cell division: Ap₄A as a signal. *TIBS* 23, 157-159.
- Nishimura, A., Moriya, S., Ukai, H., Nagai, K., Wachi, M. & Yamada, Y. (1997) Diadenosine 5',5'''-P¹,P⁴-tetrphosphate (Ap₄A) controls the timing of cell division in *Escherichia coli*. *Genes to Cells* 2, 401-413.
- Ohta, M., Inoue, H., Cotticelli, M.G., Kastury, K., Baffa, R., Palazzo, J., Siprashvili, Z., Mori, M., McCue, P., Druck, T., Croce, C.M. & Huebner, K. (1996) The *FHIT* gene, spanning the chromosome 3p14.2 fragile site and renal carcinoma-associated t(3;8) breakpoint, is abnormal in digestive tract cancers. *Cell* 84, 587-597.
- O'Handley, S.F., Frick, D.N., Dunn, C.A. & Bessman, M.J. (1998) Orf186 represents a new member of the Nudix hydrolases, active on adenosine (5')triphospho (5')adenosine, ADP-ribose, and NADH. *J. Biol. Chem.* 273, 3192-3197.
- Ortiz, B., Sillero, A. & Günther Sillero, M.A. (1993) Specific synthesis of adenosine (5') tetraphospho (5') nucleoside and adenosine (5') oligophospho (5') adenosine (n>4) catalyzed by firefly luciferase. *Eur. J. Biochem.* 212, 263-270.
- Philipp, D.P. & Parsons, P. (1979) Kinetic characterization of long chain fatty acyl coenzyme A ligase from rat liver mitochondria. *J. Biol. Chem.* 254, 10785-10790.
- Pinto, R.M., Canales, J., Günther Sillero, M.A. & Sillero, A. (1986) Diadenosine tetraphosphate activates cytosol 5'-nucleotidase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 138, 261-267.
- Pintor, J., Torres, M., Castro, E. & Miras-Portugal, M.T. (1991) Characterization of diadenosine tetraphosphate (Ap₄A) binding sites in cultured chromaffin cells: evidence for a P_{2Y} site. *Br. J. Pharmacol.* 103, 1980-1984.
- Pintor, J., Kowalewski, H.J., Torres, M., Miras-Portugal, M. T. & Zimmermann, H. (1992a) Synaptic vesicle storage of diadenosine polyphosphates in the *Torpedo* electric organ. *Neurosci. Res. Commun.* 10, 9-15.
- Pintor, J., Díaz-Rey, M.A., Torres, M., & Miras-Portugal, M.T. (1992b) Presence of diadenosine polyphosphates-Ap₄A and Ap₅A- in rat brain synaptic terminals. Ca²⁺ dependent release evoked by 4-aminopyridine and veratridine. *Neurosci. Lett.* 136, 141-144.
- Pintor, J., Rotllán, P., Torres, M., & Miras-Portugal, M.T. (1992c) Characterization and quantification of diadenosine hexaphosphate in chromaffin cells: granular storage and secretagogue-induced release. *Anal. Biochem.* 200, 296-300.
- Pintor, J., Díaz-Rey, M.A. & Miras-Portugal, M.T. (1993) Ap₄A and ADP-β-S binding to P₂ purinoreceptors present on rat brain synaptic terminals. *Br. J. Pharmacol.* 108, 1094-1099.
- Pintor, J. & Miras-Portugal, M.T. (1995) P₂ purinergic receptors for diadenosine polyphosphates in the nervous system. *Gen. Pharmacol.* 26, 229-235.

- Plateau, P., Fromant, M. & Blanquet, S. (1987) Heat shock and hydrogen peroxide responses of *Escherichia coli* are not changed by dinucleoside tetraphosphate hydrolase overproduction. *J Bacteriol* 169: 3817-3820.
- Plateau, P., Fromant, M., Schmitter, J.M., Buhler, J.M. & Blanquet, S. (1989) Isolation, characterization, and inactivation of the *APA1* gene encoding yeast diadenosine 5',5'''-P¹,P⁴-tetraphosphate phosphorylase. *J Bacteriol* 171: 6437-6445.
- Purich, D.L. & Fromm, H.J. (1972) Inhibition of rabbit skeletal muscle adenylate kinase by the transition state analogue, P¹,P⁴-di(adenosine-5')tetraphosphate. *Biochim. Biophys. Acta* 276: 563-567.
- Rapaport, E. & Zamecnik, P.C. (1976) Presence of diadenosine 5',5'''-P¹,P⁴-tetraphosphate (Ap₄A) in mammalian cells in levels varying widely with proliferative activity of the tissue: a possible positive "pleiotypic activator". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73: 3984-3988.
- Razzell, W.E. (1963) Phosphodiesterases. *Methods Enzymol.* 6: 236-258.
- Renart, M.F., Renart J., Sillero, M.A.G. & Sillero, A. (1976) Guanosine monophosphate reductase from *Artemia salina*: Inhibition by xanthosine monophosphate and activation by diguanosine tetraphosphate. *Biochemistry* 15: 4962-4966.
- Remy, P. (1992) Intracellular functions of Ap₄N: eukaryotes. En: Ap₄A and other dinucleoside polyphosphates, pp.151-204, McLennan, A.G. (ed) CRC Press, Boca Raton, Fl.
- Robinson, A.K. & Barnes, L.D. (1986) Three diadenosine 5',5'''-P¹,P⁴-tetraphosphate hydrolytic enzymes from *Physarum polycephalum* with differential effects by calcium: a specific dinucleoside polyphosphate pyrophosphohydrolase, a nucleotide pyrophosphatase, and a phosphodiesterase. *Arch. Biochem. Biophys.* 248: 502-515.
- Rodriguez del Castillo, A., Torres, M., Delicado, E.G. & Miras Portugal, M.T. (1988) Subcellular distribution studies of diadenosine polyphosphates-Ap₄A and Ap₅A-in bovine adrenal medulla: presence in chromaffin granules. *J. Neurochem.* 51: 1696-1703.
- Romaniuk, P.J. & Uhlenbeck, O.C. (1983) Joining of RNA molecules with RNA ligase. *Methods Enzymol.* 100: 52-59.
- Rose, G., Bar-Tana, J. & Shapiro, B. (1979) Palmitoyl coenzyme A synthetase activation by uncomplexed ATP. *Biochim. Biophys. Acta* 573: 126-135.
- Rotllán, P., Rodríguez-Ferrer, C. R., Asensio, A. C. & Oaknin, S. (1998) Potent inhibition of specific diadenosine polyphosphate hydrolases by suramin. *FEBS Lett.* 429: 143-146.
- Runnels, J. M., Soltis, D., Hey, T. & Snyder, L. (1982) Genetic and physiological studies of the role of the RNA ligase of bacteriophage T4. *J. Mol. Biol.* 154: 273-286.
- Sacks, J. (1955) Adenosine pentaphosphate from commercial ATP. *Biochim. Biophys. Acta* 16: 436.
- Safrany, S.T., Ingram, S.W., Cartwright, J. L., Falck, J. R., McLennan, A.G., Barnes, L.D. & Shears, S.B. (1999) The diadenosine hexaphosphate hydrolases from *Schizosaccharomyces pombe* and *Saccharomyces cerevisiae* are homologues of the human diphosphoinositol polyphosphate phosphohydrolase: overlapping substrate specificities in a MutT-type protein. *J. Biol. Chem.* 274: 21735-21740.

- Schlüter, H., Offers, E., Brüggemann, G., van der Giet, M., Tepel, M., Nordhoff, E., Karas, M., Spieker, C., Witzel, H. & Zidek, W. (1994) Diadenosine phosphates and the physiological control of blood pressure. *Nature* 367: 186-188.
- Schlüter, H., Tepel, M. & Zidek, W. (1996) Vascular actions of diadenosine phosphates. *J. Auton. Pharmacol.* 16: 357-362.
- Schlüter, H., Gross, I., Bachmann, J., Kaufmann, R., van der Giet, M., Tepel, M., Nofer, J.R., Assmann, G., Karas, M., Jankowski, J. & Zidek, W. (1998) Adenosine(5') oligophospho-(5') guanosines and guanosine(5') oligophospho-(5') guanosines in human platelets. *J. Clin. Invest.* 101: 682-688.
- Schulze-Lohoff, E., Zanner, S., Ogilvie, A. & Sterzel, R.B. (1995) Vasoactive diadenosine polyphosphates promote growth of cultured renal mesangial cells. *Hypertension* 26: 899-904.
- Seraphin, B. (1992) The HIT protein family: a new family of proteins present in prokaryotes, yeast and mammals. *J. DNA Seq. Map.* 3: 177-179.
- Sillero, M.A.G. & Cameselle, J.C. (1992) Interactions of dinucleoside polyphosphates with enzymes and other proteins. En: *Ap₄A and other dinucleoside polyphosphates*, pp.205-228, McLennan, A.G. (ed) CRC Press, Boca Raton, FL.
- Sillero, A. & Günther Sillero, M.A. (1989) Purine nucleotide metabolism in *Artemia*. En: *Biochemistry and cell Biology of Artemia* pp.95-111, MacRae, T., Bagshaw, J.C. & Warner, A.H. (eds) CRC press, Inc, Boca Raton, FL.
- Sillero, A. & Günther Sillero, M.A. (2000) Synthesis of dinucleoside polyphosphates catalyzed by firefly luciferase and several ligases. *Pharmacol. Ther.* En prensa.
- Sillero, M.A.G., Guranowski, A. & Sillero, A. (1991) Synthesis of dinucleoside polyphosphates catalyzed by firefly luciferase. *Eur. J. Biochem.* 202: 507-513.
- Sillero, M.A.G., Villalba, R., Moreno, A., Quintanilla, M., Lobatón, C.D. & Sillero, A. (1977) Dinucleosidetriphosphatase from rat liver: purification and properties. *Eur. J. Biochem.* 76: 331-337.
- Sillero, M. A. G., del Valle, M., Zaera, E., Michelena, P., García, A.G. & Sillero, A. (1994) Diadenosine 5',5'''-P¹,P⁴-tetrphosphate (Ap₄A), ATP and catecholamine content in bovine adrenal medulla, chromaffin granules and chromaffin cells. *Biochimie* 76: 404-409.
- Small, G. D. & Cooper, C. (1966) Studies on the occurrence and biosynthesis of adenosine tetraphosphate. *Biochemistry* 5: 26-33.
- Spector, T., Jones, T.E. & Miller, R.L. (1979) Reaction mechanism and specificity of human GMP reductase. Substrates, inhibitors, activators, and inactivators. *J. Biol. Chem.* 254: 2308-2315.
- Sugino, A., Snopek, T.J. & Cozzarelli, N.R. (1977) Bacteriophage T4 RNA ligase. Reaction intermediates and interaction of substrates. *J. Biol. Chem.* 252: 1733-1738.
- Tessier, D.C., Brousseau, R. & Vernet, T. (1986) Ligation of single-stranded oligodeoxynucleotides by T4 RNA ligase. *Anal. Biochem.* 158: 171-178.
- Thorne, N.M.H., Hankin, S., Wilkinson, M.C., Nuñez, C., Barraclough, R. & McLennan, A.G. (1995) Human diadenosine 5',5'''-P¹,P⁴-tetrphosphate pyrophosphohydrolase is a member of the MutT family of nucleotide pyrophosphatases. *Biochem. J.* 311: 717-721.

- Tomkinson, A. E., Totty, N. F., Ginsburg, M. & Lindahl, T. (1991) location of the active site for enzyme-adenylate formation in DNA ligases. *Proc Natl Acad Sci. USA* 88, 400-404.
- Uhlenbeck, O. C. & Gumpert, R. I. (1982) T4 RNA ligase. *The Enzymes* 15B, 31-58.
- Vallejo, C. G., Sillero, M. A. G. & Sillero, A. (1974) Diguanosinetetraphosphate guanylohydrolase in *Artemia salina*. *Biochim Biophys Acta* 358, 117-125.
- Van Dyke, K., Robinson, R., Urquilla, P., Smith, D., Taylor, M., Trush, M. & Wilson, M. (1977) An analysis of nucleotides and catecholamines in bovine medullary granules by anion exchange high pressure liquid chromatography and fluorescence. Evidence that most of the catecholamines in chromaffin granules are stored without associated ATP. *Pharmacology* 15, 377-391.
- Vartanian, A., Narovlyansky, A., Amchenkova, A., Turpaev, K. & Kisselev, L. (1996) Interferons induce accumulation of diadenosine triphosphate (Ap₃A) in human cultured cells. *FEBS Lett.* 381, 32-34.
- Vartanian, A., Prudovsky, I., Suzuki, H., Pra, I. D. & Kisselev, L. (1997) Opposite effects of cell differentiation and apoptosis on Ap₃A/Ap₄A ratio in human cell cultures. *FEBS Lett.* 415, 160-162.
- Walker, J., Lewis, T. E., Pivorun, E. P. & Hilderman, R. H. (1993) Activation of the mouse heart adenosine 5',5'''-P¹,P⁴- tetraphosphate receptor. *Biochemistry* 32, 1264-1269.
- Warner, A. H. & Finamore, F. J. (1965a) Isolation, purification, and characterization of P¹, P³-diguanosine 5'-triphosphate from brine shrimp eggs. *Biochim. Biophys. Acta* 108, 525-530.
- Warner, A. H. & Finamore, F. J. (1965b) Isolation, purification, and characterization of P¹, P⁴-diguanosine 5'-tetraphosphate *asymmetrical* pyrophosphohydrolase from brine shrimp eggs. *Biochemistry* 4, 1568-1575.
- Warner, A. H. & Huang, F. L. (1974a) Biosynthesis of the diguanosine nucleotides. II. Mechanism of action of GTP:GTP guanylyltransferase on nucleotide metabolism in brine shrimp embryos. *Can. J. Biochem.* 52, 241-251.
- Warner, A. H., Beers, P. C. & Huang, F. L. (1974b) Biosynthesis of the diguanosine nucleotides. I. Purification and properties of an enzyme from yolk platelets of brine shrimp embryos. *Can. J. Biochem.* 52, 231-240.
- Webb, M. R. & Trentham, D. R. (1980) Analysis of chiral inorganic [¹⁶O, ¹⁷O, ¹⁸O] thiophosphate and the stereochemistry of the 3-phosphoglycerate kinase reaction. *J. Biol. Chem.* 255, 1775-1779.
- Yoshihara, K. & Tanaka, Y. (1981) ADP-ribosylation of diadenosine 5',5'''-P¹,P⁴- tetraphosphate by poly(ADP-ribose) polymerase *in vitro*. *J. Biol. Chem.* 256, 6756-6761.
- Zamecnik, P. C. & Stephenson, M. L. (1969) Nucleoside pyrophosphate compounds related to the first step in protein synthesis. En: *The role of nucleotides for the function and conformation of enzymes*. Alfred Benzon Symposium I pp.276-291, Kalckar, H. M., Klenow, H., Munch-Petersen, A., Ottesen, M. & Thaysen, J. H (eds), Elsevier Press, Munksgaard, Copenhagen.
- Zamecnik, P. C., Stephenson, M. L., Janeway, C. M. & Randerath, K. (1966) Enzymatic synthesis of diadenosine tetraphosphate and diadenosine triphosphate with a purified lysyl-sRNA synthetase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 24, 91-97.

- Zamecnik, P.C., Rapaport, E. & Baril, E.F. (1982) Priming of DNA synthesis by diadenosine 5',5'''-P¹,P⁴-tetrphosphate with a double stranded octadecamer as a template and DNA polymerase α . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 1791-1794.
- Zamecnik, P.C., Kim, B., Gao, M.J., Taylor, G. & Blackburn, G.M. (1992) Analogues of diadenosine 5',5'''-P¹,P⁴-tetrphosphate (Ap₄A) as potential anti-platelet-aggregation agents. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 2370-2373.

T4 DNA ligase synthesizes dinucleoside polyphosphates

Olga Madrid, Daniel Martín, Eva Ana Atencia, Antonio Sillero, María A. Günther Sillero*

Departamento de Bioquímica, Instituto de Investigaciones Biomédicas, CSIC, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid, Arzobispo Morcillo 4, 28029 Madrid, Spain

Received 24 June 1998

Abstract T4 DNA ligase (EC 6.5.1.1), one of the most widely used enzymes in genetic engineering, transfers AMP from the E-AMP complex to tripolyphosphate, ADP, ATP, GTP or dATP producing p₁A, Ap₃A, Ap₁A, Ap₄G and Ap₄dA, respectively. Nicked DNA competes very effectively with GTP for the synthesis of Ap₄G and, conversely, tripolyphosphate (or GTP) inhibits the ligation of DNA by the ligase. As T4 DNA ligase has similar requirements for ATP as the mammalian DNA ligase(s), the latter enzyme(s) could also synthesize dinucleoside polyphosphates. The present report may be related to the recent finding that human Fhit (fragile histidine triad) protein, encoded by the *FHIT* putative tumor suppressor gene, is a typical dinucleoside 5'-5"-P¹,P³-triphosphate (Ap₃A) hydrolase (EC 3.6.1.29).

© 1998 Federation of European Biochemical Societies.

Key words: Ap₃A; Ap₁A; p₁A; *FHIT* gene; T4 DNA ligase; Dinucleoside polyphosphate

1. Introduction

Dinucleoside polyphosphates (Np_nN) are compounds of increasing interest in metabolic regulation and in cell signalling [1–3]. Ap₁A is present at (sub)micromolar concentrations in all the prokaryotic and eukaryotic tissues examined [4]. Ap₁A and other Np_nN may participate in the regulation of purine nucleotides [5,6], in cellular response to stress [2], in the control of cell proliferation [7], in the interferon action [8], as transition state analogues of some kinases [9], etc. Ap₁A and other dinucleoside polyphosphates are present in chromaffin granules of bovine adrenal medulla [10–12], in synaptic terminals [13] and in human blood platelets [14]. After an appropriate stimulus they are released from these storage sites to the blood and through their interaction with some still not well defined purine receptors [15–19] they may modulate a variety of processes such as vascular tone [20], platelet aggregation [20,21], neurotransmission [22], cell proliferation [3,7,23], etc.

The interest in dinucleoside polyphosphates was rekindled after the discovery that the fragile histidine triad (*FHIT*), a putative tumor suppressor gene [24], encodes a typical dinucleoside triphosphate hydrolase (EC 3.6.1.29) [25], an enzyme that cleaves Ap₃A to AMP and ADP [26,27]. The crystal

structure of the Fhit protein showing its interaction with Ap₃A has been reported [28,29].

The intracellular level of dinucleoside polyphosphates results from their rate of synthesis and degradation. A variety of enzymes have been described in mammals, plants, lower eukaryotes and prokaryotes able to cleave specifically dinucleoside polyphosphates [30]. There are also unspecific phosphodiesterases present in the outer aspect of the membranes of most mammalian cells examined that hydrolyze Np_nN to the corresponding nucleoside 5'-monophosphates [30–32]. It was believed, since 1966, that aminoacyl-tRNA synthetases were the enzymes responsible for the synthesis of Ap₁A in vivo [33]. In 1990 the hypothesis was put forward that those ligases which catalyze the transfer of a nucleotidyl moiety, via nucleotidyl containing intermediates and releasing PP_i, may catalyze the synthesis of Np_nN [34]. These ligases usually catalyze, in a first step, the formation of an E-X-AMP intermediate with liberation of PP_i. In a second step, the acyl residue (X) of the complex is joined to an alcohol (Y) giving rise to X-Y. In the presence of pyrophosphatase and in the absence of Y, the AMP moiety of the E-X-AMP complex can be transferred to a nucleoside triphosphate (NTP) generating Ap₁N. Firefly luciferase (although classified as an oxygenase, EC 1.13.12.7) catalyzes very effectively the synthesis of nucleoside 5'-polyphosphates (p_nA, n=3–20), diadenosine polyphosphates (Ap_nA, n=4–16), and a variety of dinucleoside tetraphosphates (Ap₁N, N=any nucleoside) using luciferin, ATP and polyphosphates or NTP as cofactors [35]. Yeast acetyl-CoA synthetase [36] and *Pseudomonas fragi* acyl-CoA synthetase [37] catalyze also, to a lesser extent, the synthesis of (di)nucleoside polyphosphates.

The synthesis of (di)nucleoside polyphosphates by T4 DNA ligase is here described for the first time.

2. Materials and methods

2.1. Materials

T4 DNA ligase was purchased from Pharmacia (ref. 27-0870; lot 7100870041). λ DNA/*Hind*III fragments were from Gibco BRL. Sodium tripoly- or trimetaphosphates were from Sigma. Inorganic pyrophosphatase (EC 3.6.1.1) and alkaline phosphatase (grade I) (EC 3.1.3.1) were obtained from Boehringer Mannheim. Dinucleoside tetraphosphatase (EC 3.6.1.17) was purified from rat liver as previously described [38]. Thin layer chromatographic (TLC) silica gel fluorescent plates were from Merck. For autoradiography X-ray films from Konica Corporation (Japan) were used. The amount of labelled nucleotides was quantified with an InstantImager (Packard Instrument Co). HPLC was carried out in a Hewlett Packard chromatograph (model 1090), with a diode array detector, commanded by an HPLC ChemStation.

2.2. T4 DNA ligase-AMP complex formation

The reaction mixture (0.02 ml) contained 50 mM HEPES-KOH pH 6.7, 1 mM dithiothreitol, 5 mM MgCl₂, 0.01 mM (0.1 μ Ci) [α -³²P]ATP, 0.02 U of desalted pyrophosphatase and, when indicated,

*Corresponding author. Fax: (34) (1) 3975353.
E-mail: magunther@iib.uam.es

Abbreviations: Ap₃A, diadenosine triphosphate or adenosine(5')-triphospho(5')adenosine; Ap₁A, diadenosine tetraphosphate or adenosine(5')tetraphospho(5')adenosine; Ap₄dA, adenosine(5')tetraphospho(5')2'-deoxyadenosine; Ap₄G, adenosine(5')tetraphospho(5')guanosine; Ap₁N, adenosine(5')tetraphospho(5')nucleoside; Np_nN, dinucleoside polyphosphates; meta P₃, trimetaphosphate; P₃, tripolyphosphate; p₁A, adenosine 5'-tetraphosphate

tripolyphosphate (P_3) or GTP. The mixture was incubated for 15 min to remove the potential PP_i contaminating the commercial preparations of P_3 or GTP. The formation of the E-AMP complex was initiated by addition of 0.49 μ g (3438 Weiss units/mg) of T4 DNA ligase. After 15 min incubation, reactions were stopped with 6.5 μ l of concentrated SDS sample buffer (0.25 M Tris-HCl pH 6.8, 8% SDS, 40% glycerol, 240 mM dithiothreitol, 0.005% bromophenol blue). The mixtures were heated at 90°C for 3 min and 15 μ l aliquots loaded onto a 12% denaturing polyacrylamide gel. The gel was stained with Coomassie blue, dried down and the labelled enzyme-adenylate complex detected by autoradiography.

2.3. Synthesis and characterization of (di)nucleoside polyphosphates

The reaction mixtures (Figs. 2–4) were analyzed by TLC or HPLC. In the first case, aliquots (2 μ l) of the reactions were taken, spotted on a TLC silica gel plate, along with standards of Ap_3G and p_1A (Fig. 2), or Ap_2A , Ap_1A and Ap_1dA (Fig. 3), and developed in dioxane:ammonium hydroxide:water (6:1:6, by volume) (Figs. 2 and 4) or in dioxane:ammonium hydroxide:water (6:1:4, by volume) (Fig. 3). Nucleotide spots were localized with a 253 nm wavelength light and the corresponding radioactivity measured by autoradiography and/or with an InstantImager. When analyzed by HPLC, aliquots (0.01 ml) of the reaction were transferred into 0.14 ml hot water and kept at 95°C for 1.5 min. After chilling, the mixtures were filtered and a 0.05 ml aliquot injected into a Hypersil ODS column. Elution was performed at a flow rate of 0.5 ml/min with a 20 min linear gradient (5–30 mM) of sodium phosphate, pH 7.5, in 20 mM tetrabutylammonium bromide, 20% methanol (buffer A) followed, when pertinent, by a 10 min linear gradient (30–100 mM) of sodium phosphate, pH 7.5 in buffer A.

2.4. DNA ligation

The reaction mixture (0.02 ml) contained 50 mM HEPES-KOH pH 7.2, 1 mM dithiothreitol, 0.02 mM ATP, 0.02 U desalted pyrophosphatase, 0.25 μ g of λ DNA/HindIII fragments, P_3 or trimetaphosphate (meta- P_3) as indicated and 5 mM $MgCl_2$ in excess over that of tri(meta)phosphate. Reaction mixtures were incubated at 30°C for 30 min (to remove contaminant PP_i); thereafter 0.03 μ g of T4 DNA ligase was added and, at the indicated times, 5 μ l aliquots of the reaction mixtures were taken, added to 1 μ l of a solution containing 0.25% bromophenol blue, 30% glycerol, 125 mM EDTA, heated for 10 min at 65°C and loaded onto wells of an 0.8% agarose gel. After electrophoresis ligation products were visualized by ethidium bromide staining.

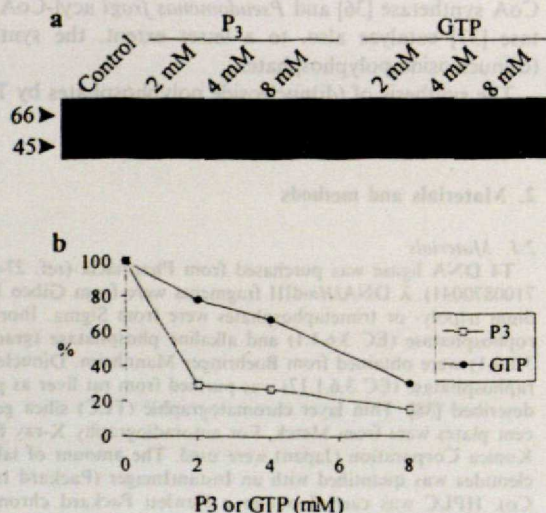
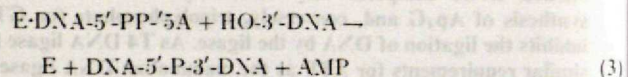
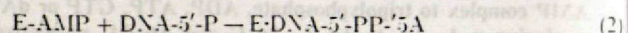


Fig. 1. Inhibition of T4 DNA ligase-adenylate complex formation by tripolyphosphate (P_3) or GTP. a: The relevant portion of the autoradiogram is shown. The sizes (in kDa) of coelectrophoresed marker proteins are indicated by the arrows on the left. b: The inhibition (—) of adenylation of the enzyme by P_3 or GTP was quantified in an InstantImager.

3. Results and discussion

3.1. Formation of the E-AMP complex and its reaction with tripolyphosphate (P_3) or GTP

T4 DNA ligase, one of the most widely used enzymes in genetic engineering, belongs to the group of ATP-dependent ligases, in which the mammalian DNA ligases are included [39,40]. It catalyzes the formation of phosphodiester bonds between neighboring 3'-hydroxyl and 5'-phosphate ends in double-stranded DNA (reactions 1–3):



When T4-DNA ligase was incubated with [α - ^{32}P]ATP formation of the complex E-AMP was observed (Fig. 1a), as expected, in a position corresponding to a molecular mass of about 57 kDa [40]. In the presence of pyrophosphatase, the AMP moiety of the complex was displaced by P_3 or by GTP, in a concentration dependent manner (Fig. 1b).

3.2. Synthesis of p_1A and Ap_1G catalyzed by T4 DNA ligase

The fate of AMP from the E-AMP complex was followed by incubating the enzyme in the absence of DNA and in the presence of [α - ^{32}P]ATP and P_3 or GTP. The reaction was followed by TLC (Fig. 2a,b). The radioactivity under the ATP spot was gradually displaced towards new radioactive compounds corresponding, presumably, to p_1A and Ap_1G (Fig. 2). The nature of the newly synthesized radioactive products was assessed as p_1A and Ap_1G by the following criteria: comigration (TLC) or coelution (HPLC) with standards; treatment with alkaline phosphatase; treatment of the radioactive [adenylate- ^{32}P]AppppG with purified rat liver dinucleoside tetraphosphatase [30,38] which gave radioactive chromatographic spots corresponding to [α - ^{32}P]AMP and [α - ^{32}P]ATP (Fig. 2c). The synthesis of p_1A was further analyzed by HPLC. It eluted in the same position as a standard of p_1A (Fig. 2d). Treatment of the synthesized p_1A with alkaline phosphatase gave chromatographic peaks corresponding to ATP, ADP, AMP and adenosine (Fig. 2d). The synthesis of p_1A and Ap_1G by T4 DNA ligase was unequivocally demonstrated.

3.3. Synthesis of Ap_1A , Ap_1dA and Ap_1G catalyzed by T4 DNA ligase

The K_m values for ATP in the first step of the reaction (formation of the E-AMP complex) is in the order of μ M [41]. The apparent K_m values determined for P_3 and GTP in the second step of the reaction (formation of p_1A and Ap_1G , respectively) are in the order of mM (results not shown). These results were reminiscent of those obtained with firefly luciferase [35] and other ligases [36,37] in which the K_m values for the AMP acceptor substrate (P_3 , ATP, GTP, etc.) were in the mM range. In spite of these limitations, DNA ligase catalyzes the synthesis of Ap_1A , using 20 μ M ATP as substrate (Fig. 3, lanes 2–4). T4 DNA ligase was also able to transfer

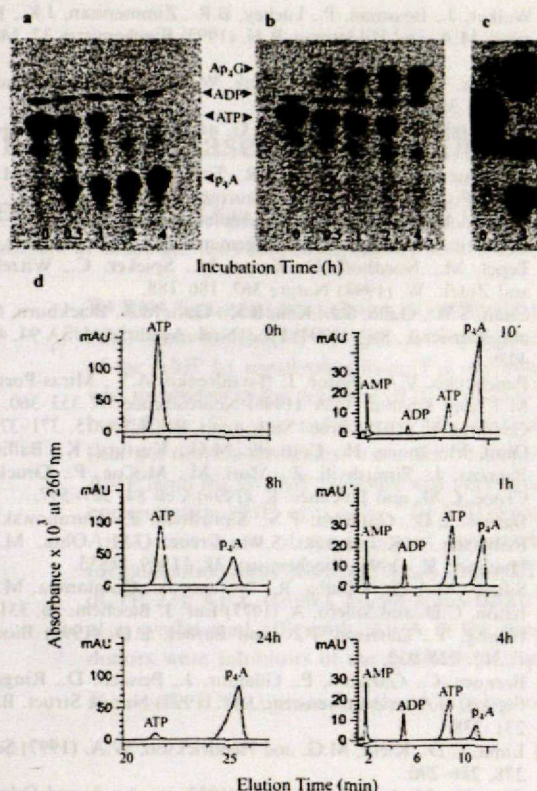


Fig. 2. Synthesis of adenosine tetraphosphate (p₁A) and adenosine-(5')tetraphospho(5')guanosine (Ap₁G) catalyzed by T4 DNA ligase. a, b: The reaction mixtures (0.03 ml) contained 50 mM HEPES-KOH (pH 7.2), 1 mM dithiothreitol, 5 mM MgCl₂, 0.02 mM (0.1 μ Ci) [α -³²P]ATP, 0.03 U desalted pyrophosphatase, 0.74 μ g T4 DNA ligase and 1 mM P_i (a) or 1 mM GTP (b). Aliquots of the reactions were taken, at the indicated times, and analyzed by TLC (a, b) (see Section 2). c: Characterization of the synthesized Ap₁G. The remainder of the reaction mixture described in (b) was treated with 0.4 mU of dinucleoside tetraphosphatase and, after 3 h incubation at 37°C, analyzed by TLC. d: Synthesis and characterization of p₁A followed by HPLC. The reaction mixture (0.1 ml) for the synthesis contained 50 mM HEPES-KOH (pH 7.2), 1 mM dithiothreitol, 5 mM MgCl₂, 0.03 U desalted pyrophosphatase, 0.74 μ g T4 DNA ligase, 1 mM ATP, and 3 mM P_i. Aliquots were taken at the indicated times and analyzed using a 4.6 \times 100 mm Hypersil ODS column (panel at the left). The remainder of the mixture (0.06 ml) was treated with 1 U alkaline phosphatase and the products of the reaction analyzed using a 2.1 \times 100 mm Hypersil ODS column (panel at the right).

the AMP moiety of the E-AMP complex to ADP or dATP yielding Ap₁A (Fig. 3, lanes 5–7) and Ap₁dA (Fig. 3, lanes 8–10), as characterized by coelution with markers (Fig. 3).

3.4. P_i inhibits the ligation of DNA by T4 DNA ligase

From Eqs. 1–3 it appears that P_i or GTP could compete with DNA for the same E-AMP complex. In fact, DNA competes very effectively with GTP for the synthesis of Ap₁G (Fig. 4) and conversely P_i (or GTP, not shown) inhibited the ligation of λ DNA/HindIII fragments by the ligase (Fig. 5).

3.5. Concluding remarks

T4 DNA ligase belongs to the subclass EC 6.5 and, contrary to other ligases of subclasses EC 6.1 and EC 6.2, is both acceptor and donor of AMP without any need for an E-X-



Fig. 3. Synthesis of Ap₁A, Ap₂A and Ap₃A catalyzed by T4 DNA ligase. The reaction mixture (0.02 ml) contained 50 mM MES-KOH pH 6.7, 1 mM dithiothreitol, 5 mM MgCl₂, 0.02 mM (0.1 μ Ci) [α -³²P]ATP, 0.02 U desalted pyrophosphatase and 0.49 μ g of T4 DNA ligase. Synthesis of Ap₁A: lanes 1–4, reaction times 0, 1, 2 and 4 h, respectively. Synthesis of Ap₂A or Ap₃A: the above mixture was supplemented with 4 mM ADP (lanes 5–7) or 4 mM dATP (lanes 8–10); aliquots were taken after 1, 2 and 4 h of incubation, respectively, and analyzed by TLC as indicated in Section 2.

AMP intermediate [35–37]. As T4 DNA ligase has similar requirements for ATP as the mammalian DNA ligases [39,40], the latter enzymes could also synthesize Np₁N. This opens perspectives relating these compounds to DNA replication. In this regard, dinucleoside tetraphosphatase has been reported in the nuclei of tomato cells [42], but not in mammals; there are reports relating Ap₁A or Ap₃A to cell division [1–3,7,23]; the capacity of synthesis of Ap₃A (and other dinucleoside polyphosphates) by a DNA ligase and the role given to the dinucleoside triphosphatase as a tumor suppressor activity could be interrelated; finally, the development of new antitumor drugs, particularly some (tri)polyphosphates derivatives, inhibitors of DNA ligases, could be envisaged.

Acknowledgements: We thank Isabel de Diego, Teresa García and Hocine Akli for very able technical assistance, O.M. and E.A.A. were economically supported by their parents. This work was aided

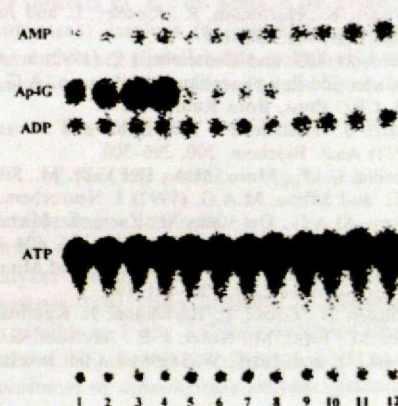


Fig. 4. Synthesis of Ap₁G catalyzed by T4 DNA ligase. Effect of DNA. The reaction mixture (0.02 ml) contained 50 mM MES-KOH pH 6.7, 1 mM dithiothreitol, 2 mM MgCl₂, 0.02 mM (0.1 μ Ci) [α -³²P]ATP, 1 mM GTP, 0.02 U desalted pyrophosphatase, 0.49 μ g T4 DNA ligase, and variable amounts of λ DNA/HindIII fragments: 0 μ g (lanes 1–4); 0.5 μ g (lanes 5–8); 5 μ g (lanes 9–12). Aliquots of the reaction were taken after 0.5, 1, 2 and 3 h of incubation, respectively, spotted on TLC and analyzed as described in Section 2.

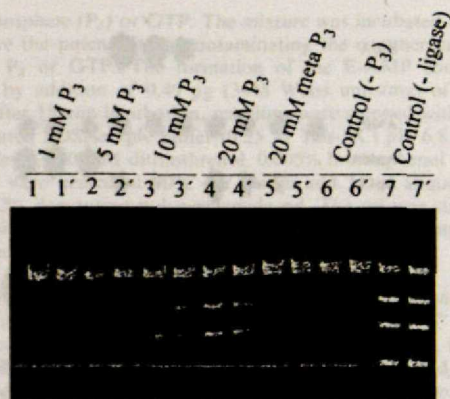


Fig. 5. Ligation of λ DNA/HindIII fragments catalyzed by T4 DNA ligase. Inhibition by P_3 . Reaction mixtures containing λ DNA/HindIII fragments were incubated in the presence (or absence) of T4 DNA ligase and the compounds indicated. After incubation for 5 min (lanes 1-7) or 15 min (lanes 1'-7') at 30°C, aliquots of the reaction mixtures were subjected to electrophoresis in a 0.8% agarose gel as indicated in Section 2.

by a Grant (PM 95/13) from the Dirección General de Investigación Científica y Técnica.

References

- [1] McLennan, A.G. (1992) *Ap₁A and Other Dinucleoside Polyphosphates*. CRC Press, Boca Raton, FL.
- [2] Kisselev, L.L., Justesen, J., Wolfson, A.D. and Frolova, L.Y. (1998) FEBS Lett. 427, 157-163.
- [3] Baxi, M.D. and Vishwanatha, J.K. (1995) J. Pharmacol. Toxicol. Methods 33, 121-128.
- [4] Garrison, P.N. and Barnes, L.D. (1992) in: *Ap₁A and Other Dinucleoside Polyphosphates* (McLennan, A.G., Ed.), pp. 29-61, CRC Press, Boca Raton, FL.
- [5] Pinto, R.M., Canales, J., Günther Sillero, M.A. and Sillero, A. (1986) Biochem. Biophys. Res. Commun. 138, 261-267.
- [6] Sillero, A. and Günther Sillero, M.A. (1989) in: *Biochemistry and Cell Biology of Artemia* (MacRae, T.H., Bagshaw, J.C. and Warner, A.H., Eds.), pp. 95-111, CRC Press, Boca Raton, FL.
- [7] Nishimura, A. (1998) Trends Biochem. Sci. 23, 157-159.
- [8] Turpaev, K., Hartmann, R., Kisselev, L. and Justesen, J. (1997) FEBS Lett. 408, 177-181.
- [9] Sillero, M.A.G. and Cameselle, J.C. (1992) in: *Ap₁A and Other Dinucleoside Polyphosphates* (McLennan, A.G., Ed.), pp. 205-228, CRC Press, Boca Raton, FL.
- [10] Pintor, J., Rotllán, P., Torres, M. and Miras-Portugal, M.T. (1992) Anal. Biochem. 200, 296-300.
- [11] Castillo, C.J.F., Moro, M.A., Del Valle, M., Sillero, A., Garcia, A.G. and Sillero, M.A.G. (1992) J. Neurochem. 59, 723-732.
- [12] Sillero, M.A.G., Del Valle, M., Zaera, E., Michelena, P., Garcia, A.G. and Sillero, A. (1994) Biochimie 76, 404-409.
- [13] Pintor, J., Diaz-Rey, M.A., Torres, M. and Miras-Portugal, M.T. (1992) Neurosci. Lett. 136, 141-144.
- [14] Schlüter, H., Gross, L., Bachmann, J., Kaufmann, R., Van der Giet, M., Tepel, M., Nofer, J.-R., Assmann, G., Karas, M., Janowski, J. and Zidek, W. (1998) J. Clin. Invest. 101, 682-688.

- [15] Walker, J., Bossman, P., Lackey, B.R., Zimmerman, J.K., Dimick, M.A. and Hilderman, R.H. (1993) Biochemistry 32, 14009-14014.
- [16] Schlüter, H., Tepel, M. and Zidek, W. (1996) J. Auton. Pharmacol. 16, 357-362.
- [17] Edgecombe, M., McLennan, A.G. and Fisher, M.J. (1996) Biochem. J. 314, 687-693.
- [18] Rodríguez-Pascual, F., Cortes, R., Torres, M., Palacios, J.M. and Miras-Portugal, M.T. (1997) Neuroscience 77, 247-255.
- [19] Burnstock, G. (1997) Neuropharmacology 36, 1127-1139.
- [20] Schlüter, H., Offers, E., Brüggemann, G., Van der Giet, M., Tepel, M., Nordhoff, E., Karas, M., Spieker, C., Witzel, H. and Zidek, W. (1994) Nature 367, 186-188.
- [21] Chan, S.W., Gallo, S.J., Kim, B.K., Guo, M.J., Blackburn, G.M. and Zamecnik, P.C. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 4034-4039.
- [22] Panchenko, V.A., Pintor, J., Tsyndrenko, A.Y., Miras-Portugal, M.T. and Krishtal, O.A. (1996) Neuroscience 70, 353-360.
- [23] Grummt, F. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 371-375.
- [24] Ohta, M., Inoue, H., Cotticelli, M.G., Kastury, K., Baffa, R., Palazzo, J., Siprashvili, Z., Mori, M., McCue, P., Druck, T., Croce, C.M. and Huebner, K. (1996) Cell 84, 587-597.
- [25] Barnes, L.D., Garrison, P.N., Siprashvili, Z., Guranowski, A., Robinson, A.K., Ingram, S.W., Croce, C.M., Ohta, M. and Huebner, K. (1996) Biochemistry 35, 11529-11535.
- [26] Sillero, M.A.G., Villalba, R., Moreno, A., Quintanilla, M., Lobatón, C.D. and Sillero, A. (1977) Eur. J. Biochem. 76, 331-337.
- [27] Huang, Y., Garrison, P.N. and Barnes, L.D. (1995) Biochem. J. 312, 925-932.
- [28] Brenner, C., Garrison, P., Gilmour, J., Peisach, D., Ringe, D., Petsko, G.A. and Lowenstein, J.M. (1997) Nature Struct. Biol. 4, 231-238.
- [29] Lima, C.D., Klein, M.G. and Hendrickson, W.A. (1997) Science 278, 286-290.
- [30] Guranowski, A. and Sillero, A. (1992) in: *Ap₁A and Other Dinucleoside Polyphosphates* (McLennan, A.G., Ed.), pp. 81-133, CRC Press, Boca Raton, FL.
- [31] Ogilvie, A. (1992) in: *Ap₁A and Other Dinucleoside Polyphosphates* (McLennan, A.G., Ed.), pp. 229-273, CRC Press, Boca Raton, FL.
- [32] Zimmermann, H. (1996) Prog. Neurobiol. 49, 589-618.
- [33] Plateau, P. and Blanquet, S. (1992) in: *Ap₁A and Other Dinucleoside Polyphosphates* (McLennan, A.G., Ed.), pp. 63-79, CRC Press, Boca Raton, FL.
- [34] Guranowski, A., Günther Sillero, M.A. and Sillero, A. (1990) FEBS Lett. 271, 215-218.
- [35] Ortiz, B., Sillero, A. and Günther Sillero, M.A. (1993) Eur. J. Biochem. 212, 263-270.
- [36] Guranowski, A., Günther Sillero, M.A. and Sillero, A. (1994) J. Bacteriol. 176, 2986-2990.
- [37] Fontes, R., Günther Sillero, M.A. and Sillero, A. (1998) J. Bacteriol. (in press).
- [38] Sillero, M.A.G., Madrid, O., Zaera, E. and Sillero, A. (1997) Biochim. Biophys. Acta 1334, 191-199.
- [39] Armstrong, J., Brown, R.S. and Tsugita, A. (1983) Nucleic Acids Res. 11, 7145-7156.
- [40] Lindahl, T. and Barnes, D.E. (1992) Annu. Rev. Biochem. 61, 251-281.
- [41] Weiss, B., Jacquemin-Sablon, A., Live, T.R., Fareed, G.C. and Richardson, C.C. (1968) J. Biol. Chem. 243, 4543-4555.
- [42] Hause, B., Feussner, K. and Wasternack, C. (1997) Bot. Acta 110, 452-457.

T4 RNA ligase catalyzes the synthesis of dinucleoside polyphosphates

Eva Ana Atencia, Olga Madrid, María A. Günther Sillero and Antonio Sillero

Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols, UAM/CSIC, Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Madrid, Spain

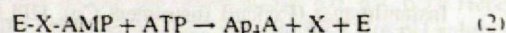
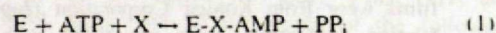
T4 RNA ligase has been shown to synthesize nucleoside and dinucleoside 5'-polyphosphates by displacement of the AMP from the E-AMP complex with polyphosphates and nucleoside diphosphates and triphosphates. Displacement of the AMP by tripolyphosphate (P_3) was concentration dependent, as measured by SDS/PAGE. When the enzyme was incubated in the presence of 0.02 mM [α - ^{32}P] ATP, synthesis of labeled Ap_4A was observed: ATP was acting as both donor (K_m , μM) and acceptor (K_m , mM) of AMP from the enzyme. Whereas, as previously known, ATP or dATP (but not other nucleotides) were able to form the E-AMP complex, the specificity of a compound to be acceptor of AMP from the E-AMP complex was very broad, and with K_m values between 1 and 2 mM. In the presence of a low concentration (0.02 mM) of [α - ^{32}P] ATP (enough to form the E-AMP complex, but only marginally enough to form Ap_4A) and 4 mM of the indicated nucleotides or P_3 , the relative rate of synthesis of the following radioactive (di)nucleotides was observed: Ap_4X (from XTP, 100); Ap_4dG (from dGTP, 74); Ap_4G (from GTP, 49); Ap_4dC (from dCTP, 23); Ap_4C (from CTP, 9); Ap_3A (from ADP, 5); Ap_4ddA , (from ddATP, 1); p_4A (from P_3 , 200). The enzyme also synthesized efficiently Ap_3A in the presence of 1 mM ATP and 2 mM ADP. The following T4 RNA ligase donors were inhibitors of the synthesis of Ap_4G : $pCp > pAp > pA_2'p$.

Keywords: RNA ligase; dinucleoside polyphosphates; Ap_3A ; RNA joining; firefly luciferase.

Dinucleoside polyphosphates (Np_nN , a family of 5',5'-linked dinucleotides) are molecules involved in metabolic regulation and cell signaling [1–3]. These compounds, mainly diadenosine polyphosphates (Ap_nA), have been implicated in a variety of intra and extracellular roles such as: regulation of purine nucleotide metabolism, alarmones acting in the heat shock and oxidative stresses, transition-state analogues of some kinases, control of cell division, neurotransmitters, vasoregulators,

inhibitors of ATP-regulated K^+ channels, etc. [1] (reviewed in [2,3]). Interest in dinucleoside polyphosphates has increased after the discovery that the putative human tumor suppressor gene *FHIT* (for fragile histidine triad) encodes for a typical dinucleoside 5',5'''- P^1P^3 triphosphate hydrolase (EC3.6.1.29) [4], an enzyme that cleaves Ap_3A to AMP and ADP [5–8]. Crystal structure of the *fhit* protein showing its interaction with Ap_3A has been reported [9,10].

The hypothesis was put forward in 1990 that the enzymes ligases could be candidates for the synthesis of Np_nN [11]. Some ligases of the subclass EC 6.1 (as aminoacyl-tRNA synthetases) and of the subclass EC 6.2 (as acetyl-CoA synthetases and acyl-CoA synthetases) catalyze the synthesis of diadenosine tetraphosphate and other dinucleoside polyphosphates through the general reactions shown in Eqns (1) and (2) below [12–14]:



where X represents a free acid.

In addition, the oxidoreductase firefly luciferase (EC1.12.13.7) also catalyzes the synthesis of Ap_4A and other dinucleoside polyphosphates [15] using luciferin as cofactor and through reactions similar to 1 and 2. These enzymes liberate pyrophosphate and use the intermediate E-acyl-AMP as donor of AMP for the synthesis of dinucleoside polyphosphates. As reaction 1 is reversible, the synthesis of Ap_4A is greatly favoured in the presence of pyrophosphatase.

The ligases belonging to the subclass EC 6.5 catalyze the formation of phosphoric ester bonds through an intermediate E-AMP. Three enzymes are recognized in this group: EC6.5.1.1 or DNA ligase (AMP-forming); EC6.5.1.2 or DNA ligase (AMP-forming, NMN-forming) and EC6.5.1.3 or RNA ligase. The synthesis of dinucleoside polyphosphates by T4 DNA ligase (EC6.5.1.1) has been very recently reported [16].

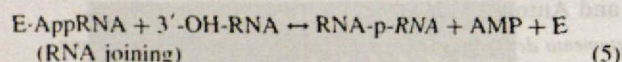
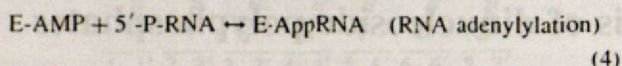
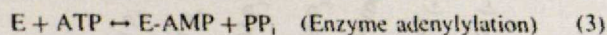
Correspondence to: A. Sillero, Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid, Arzobispo Morcillo, 4, 28029 Madrid, Spain. Fax: + 34 91 3975353. Tel.: + 34 91 3975413. E-mail: antonio.sillero@uam.es

Abbreviations: Ap_3A , adenosine(5')triphospho(5')adenosine or diadenosine triphosphate; Ap_3X , adenosine(5')triphospho(5')xanthosine; Ap_4A , adenosine(5')tetraphospho(5')adenosine; Ap_4dA , adenosine(5')tetraphospho(5')deoxyadenosine; Ap_4dC , adenosine(5')triphospho(5')deoxycytidine; Ap_4ddA , adenosine(5')tetraphospho(5')-2',3'-dideoxyadenosine; Ap_4dG , adenosine(5')tetraphospho(5')deoxyguanosine; Ap_4G , adenosine(5')tetraphospho(5')guanosine; Ap_2N , adenosine(5')tetraphospho(5')nucleoside; Ap_2X , adenosine(5')tetraphospho(5')xanthosine; Ap_3A , adenosine(5')pentaphospho(5')adenosine; ATP γ S, adenosine-5'- γ -thiotriphosphate; ddATP, 2',3'-dideoxyadenosine-5'-triphosphate; LH $_2$, luciferin; Np_nN , nucleoside(5')polyphospho(5')nucleoside; P_3 , tripolyphosphate; P_4 , tetrapolyphosphate; $P_{i,n}$, linear-chain polyphosphate with an average chain length of 15 ± 3 p_4A , adenosine-5'-tetraphosphate; Xp_4X , xanthosine(5')tetraphospho(5')xanthosine.

Enzymes: acetyl-CoA synthetase (EC6.2.1.1); acyl-CoA synthetase (EC6.2.1.3); alkaline phosphatase (EC3.1.3.1); DNA ligase (AMP-forming) (EC6.5.1.1); DNA ligase (AMP-forming, NMN-forming) (EC6.5.1.2); firefly luciferase (EC1.13.12.7); inorganic pyrophosphatase (EC3.6.1.1); RNA ligase (EC2.7.4.3).

(Received 20 January 1999, accepted 18 February 1999)

The mechanism of RNA ligases, similar to that of T4 DNA ligases [17], involves three reversible steps shown below in Eqns (3)–(5).



Depending on whether the 5'-P-RNA donor and the 3'-OH-RNA acceptor belong to the same or different RNA molecules the reaction will be intramolecular or intermolecular, respectively. In the first case T4 ligase promotes circularization of RNA. The enzyme can use either RNA or DNA as substrates [18–22].

Here we report for the first time the ability of T4 RNA ligase to catalyze the synthesis of adenosine 5'-polyphosphates and of a variety of dinucleoside polyphosphates.

MATERIALS AND METHODS

Materials

T4 RNA ligase was purchased from Boehringer Mannheim (1449478; lot numbers, 84064023-08 and 84064024-08). Electrophoresis on polyacrylamide gels, in the presence of SDS, of those preparations presented a unique band (when stained with Coomassie Blue) with an apparent molecular mass of 42 kDa. The specific activities were about 1800 U·mg⁻¹ protein. One unit (U) is the enzyme activity required to catalyze the formation of 1 nmol of [5'-³²P]rA_{12–18} into a phosphatase-resistant form in 30 min at 37 °C. Poly(A), sodium tripolyphosphate (5633) (P₃), hexaammonium tetrapolyphosphate (P₄) and sodium phosphate glass Type 15 (P₁₅) were from Sigma (Refs 5758 and 6003, respectively). The purity of the polyphosphates was checked by ion-exchange chromatography essentially as described in [23]. While P₃ and P₄ were more than 97% and 90% pure, respectively; P₁₅ was a mixture of at least 20 different (poly)phosphates [23]. Alkaline phosphatase (grade I) (EC 3.1.3.1), phosphodiesterase from *Crotalus durissus* (EC 3.1.4.1) and yeast inorganic pyrophosphatase (EC 3.6.1.1), were obtained from Boehringer Mannheim. pd(A)_{12–18} was from Pharmacia Biotech (Ref. 27-7975). [α-³²P]ATP, 3000 Ci·mmol⁻¹, was from Dupont NEN. TLC silica-gel fluorescent plates were from Merck. X-ray films were from Konica Corporation (Japan). Radioactively labeled nucleotides were quantified with the help of an InstantImager (Packard Instrument Co). HPLC was carried out in a Hewlett Packard chromatograph (model 1090), with a diode array detector, commanded by an HPLC ChemStation. The Hypersil ODS columns (2.1 × 100 mm) or (4.6 × 100 mm) were from Hewlett Packard. Ultrafiltration was performed with microconcentrators with exclusion limit membranes of 30 kDa from Vivascience.

Inorganic pyrophosphatase (used to hydrolyze the PP_i produced during the enzyme assays or the PP_i contaminating P₃) was a suspension in 3.2 M ammonium sulfate. As ammonium sulfate was an inhibitor of the reactions here described, pyrophosphatase was desalted by ultrafiltration before use.

T4 RNA ligase-AMP complex formation

The reaction mixture (0.02 mL) contained 50 mM Tris/HCl (pH 7.4), 1 mM dithiothreitol, 5 mM MgCl₂, 5 μM (0.1 μCi) [α-³²P]ATP, 0.02 U of desalted pyrophosphatase and, when

indicated tripolyphosphate (P₃). The mixture was incubated for 15 min to remove the potential PP_i contaminating the commercial preparation of P₃. The formation of the E-AMP complex was initiated by addition of 2 U of T4 RNA ligase. After 15 min incubation, reactions were stopped with 6.5 μL of concentrated SDS sample buffer (0.25 M Tris/HCl (pH 6.8), 8% SDS, 40% glycerol, 240 mM dithiothreitol, 0.005% bromophenol blue). The mixtures were heated at 90 °C for 3 min and 6-μL aliquots loaded onto a 12% denaturing polyacrylamide gel. The gel was stained with Coomassie Blue, dried down and the labeled enzyme-adenylate complex detected by autoradiography.

Synthesis of (di)nucleoside polyphosphates by T4 RNA ligase

Unless otherwise indicated the reaction mixtures contained 50 mM Tris/HCl (pH 7.4), 1 mM dithiothreitol, 5 mM MgCl₂, 1 U·mL⁻¹ of desalted pyrophosphatase, T4 RNA ligase, ATP and other nucleotides or polyphosphates as indicated. After incubation at 30 °C the reaction mixtures were analyzed by one of the following methods.

TLC. The reaction mixtures (0.02 mL) contained 0.02 mM [α-³²P]ATP (0.1 μCi). Aliquots (2 μL) of the reactions were taken, spotted on silica gel plates, along with standards, and developed in dioxane : ammonium hydroxide : water (6 : 1 : 4, or 6 : 1 : 6 by volume). Nucleotide spots were localized with a 253-nm wavelength light and the corresponding radioactivity measured by autoradiography and/or with an InstantImager.

HPLC. Aliquots (0.01 mL) of the reaction mixtures (usually in a volume of 0.05–0.1 mL) were transferred into 0.14 mL of water and kept at 95 °C for 1.5 min. After chilling, the mixtures were filtered and a 0.05-mL aliquot injected into a Hypersil ODS column (2.1 × 100 mm or 4.6 × 100 mm), as indicated. Elution was performed (for both types of columns) at a flow rate of 0.5 mL·min⁻¹ with a 20-min linear gradient (5–30 mM) of sodium phosphate (pH 7.5), in 20 mM tetrabutylammonium bromide/20% methanol (buffer A) followed, when pertinent, by a 10-min linear gradient (30–100 mM) of sodium phosphate (pH 7.5) in buffer A.

RESULTS AND DISCUSSION

Formation of the E-AMP complex and its reaction with P₃

Formation of a E-AMP complex was observed when T4 RNA ligase was incubated with [α-³²P]ATP. As expected, the complex migrated on SDS/PAGE in a position corresponding to a molecular mass of about 45 kDa [19] (Fig. 1a). In those experimental conditions (i.e. absence of PP_i because of the presence of pyrophosphatase), the AMP moiety of the complex reacted with P₃ in a concentration dependent manner (Fig. 1b).

Synthesis and characterization of Ap₄A catalyzed by T4 RNA ligase. Dependence on time and influence of pyrophosphatase.

The fate of AMP from the E-AMP complex was followed by incubating the enzyme with [α-³²P]ATP, in the absence or presence of pyrophosphatase. The reaction was followed by TLC (Fig. 2a,b). The radioactivity under the ATP spot was gradually displaced towards a new radioactive compound co-migrating with a standard of Ap₄A. In these experimental conditions the reaction was linear during 10 min (Fig. 2c). The synthesis of Ap₄A decreased with time of incubation, mainly

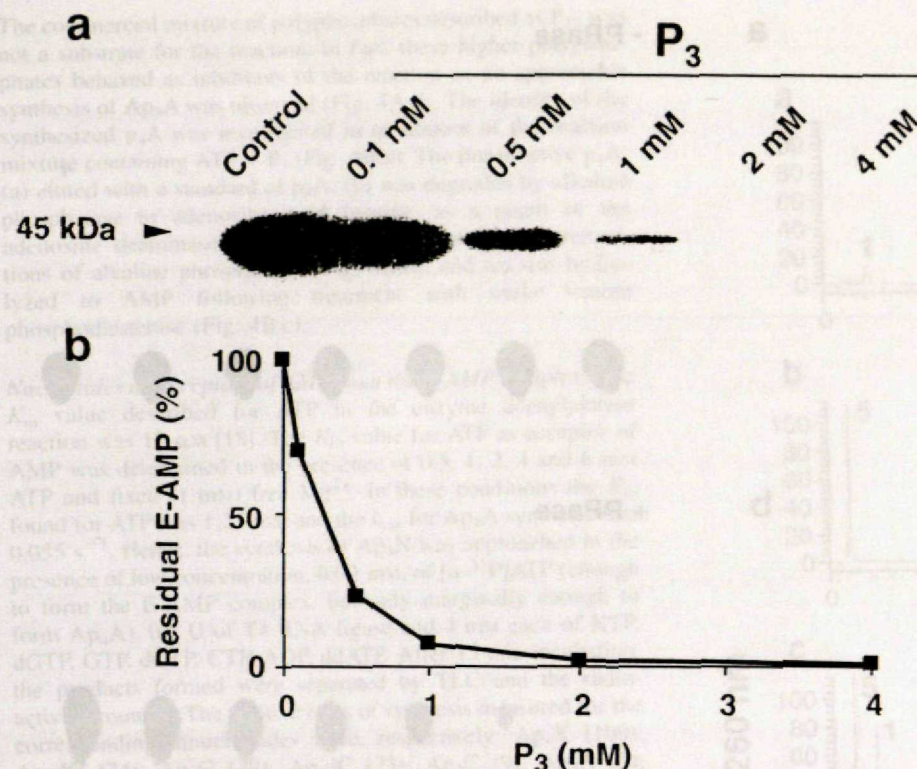


Fig. 1. Inhibition of T4 RNA ligase-adenylyl complex formation by triphosphate (P₃). (a) The enzyme was incubated with [α -³²P]ATP in the absence or presence of increasing concentrations of P₃ as indicated, and subjected to SDS/PAGE as described in Materials and methods. The relevant portion of the autoradiogram is shown. The size (in kDa) of co-electrophoresed marker proteins are indicated by the arrow at the left. (b) The inhibition (%) of the adenylation of the enzyme by P₃ was quantified in an InstantImager.

because of the low ATP concentration in the mixture. The formation of the new spot, corresponding to Ap₄A was stimulated by desalted pyrophosphatase (Fig. 2a,b). The initial rates of synthesis of Ap₄A in the absence and presence of pyrophosphatase were 0.4 and 1.2 nmol·min⁻¹·mg⁻¹ protein, respectively. In the absence of pyrophosphatase, the calculated equilibrium constant of the reaction $2\text{ATP} \leftrightarrow \text{Ap}_4\text{A} + \text{PP}_i$ was 0.005.

The synthesis and characterization of Ap₄A by T4 RNA ligase was approached in a different reaction mixture (0.05 mL) containing 2 mM ATP, 10 U of ligase, and other conditions as described in Materials and methods. After overnight incubation, the reaction products were analyzed by HPLC. Most of the ATP was transformed into a new compound, Ap₄A. Minor peaks corresponding to AMP, ADP and to a presumptive Ap₃A were also observed (Fig. 3a). Ap₄A was characterized as follows. It co-eluted with an Ap₄A standard; treatment of the mixture with alkaline phosphatase (1 μ g for 2 h at 37 °C) degraded AMP and ADP to adenosine while keeping unaltered the chromatographic peaks corresponding to the presumptive Ap₄A and Ap₃A (Fig. 3b). After inactivation of the phosphatase, the reaction mixture was further treated with phosphodiesterase (0.4 μ g) for 10, 30, 60 and 120 min (Fig. 3c-f). The main products formed as a result of Ap₄A hydrolysis were ATP and AMP. ADP was the product of the hydrolysis of the presumptive Ap₃A by the phosphodiesterase.

K_m value for GTP in the synthesis of Ap₄G

The experiments shown in Figs 2 and 3 indicated that ATP behaves both as donor of AMP for the formation of E-AMP and acceptor of AMP for the formation of Ap₄A. The *K_m* value for ATP in the first step of the reaction (formation of the E-AMP complex) is around 10 μ M [18]. In our experience with other enzymes synthesizing Ap₄A [13–15], the second step (reaction 2)

is rather unspecific and any nucleoside triphosphate (NTP) can be acceptor of AMP, acting with a high *K_m* value. For these reasons, GTP was tested as acceptor of AMP, using labeled ATP as donor. The *K_m* value for GTP in the synthesis of Ap₄G was determined in the presence of fixed (0.02 mM) [α -³²P]ATP and variable (0.1 mM to 4 mM) GTP concentrations. In these conditions, the *K_m* value found for GTP was about 1.2 mM (result not shown), and the rate of synthesis (*k_{cat}*) of Ap₄G was 0.017 s⁻¹.

Effect of pH

The effect of pH on the rate of synthesis of a dinucleoside tetraphosphate (Ap₄G) was determined in reaction mixtures containing 0.02 mM [α -³²P]ATP (0.1 μ Ci), 4 mM GTP, and 0.8 U T4 RNA ligase and 50 mM (each) of the following buffers: Mes/KOH (for pH values of 5.5, 6.0, 6.4, 6.7); HEPES/KOH (for pH values of 6.7, 7.2, 7.6); Tris/HCl (for pH values of 7.4, 8). Aliquots were taken after 15 and 30 min incubation at 30 °C and analyzed by TLC. The reaction rate increased steadily from a pH value of 6.5 up to a maximum at pH 7.4. Beyond this point the enzyme activity decreased. At pH 8.0, the enzyme activity was around 70% of the maximum.

Substrate specificity

The following aspects of the substrate specificity of T4 RNA ligase were studied in the context of the synthesis of (di)nucleoside polyphosphates.

Nucleotides able to form an E-NMP complex (NMP = nucleoside 5'-monophosphate). This was approached indirectly according to the ability to form p₄N in the presence of 0.5 mM NTP + 3 mM P₃. The relative rates found were: ATP (100), dATP (6), CTP = GTP (< 1). These results are in

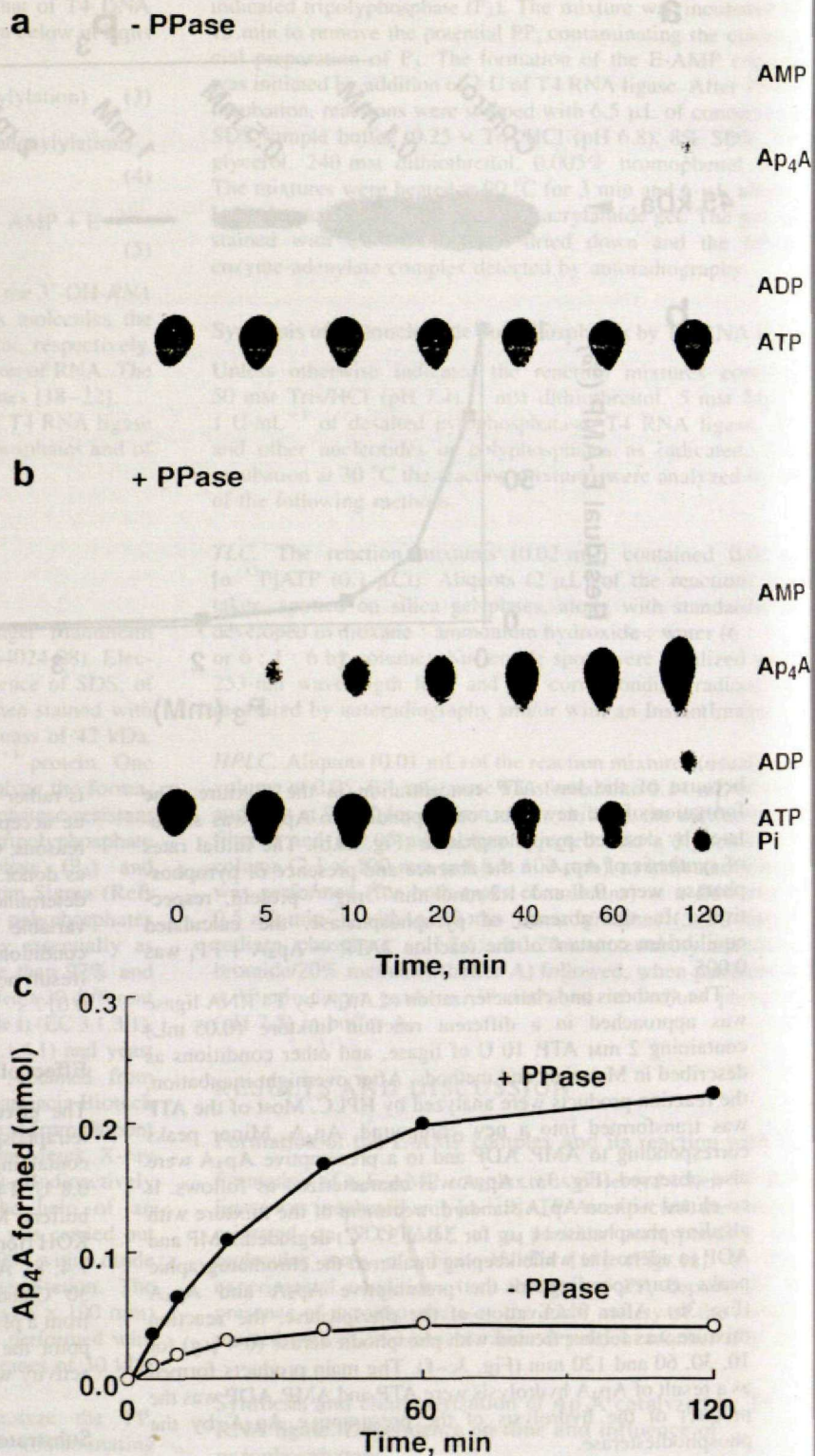


Fig. 2. Synthesis of diadenosine tetraphosphate by T4 RNA ligase: dependence on time and effect of pyrophosphatase. Two reaction mixtures were set up as described in Materials and methods, containing 0.02 mM [α -³²P]ATP in the absence (a) and presence (b) of desalted pyrophosphatase (PPase), 2 mM MgCl₂ and 6.6 U T4 RNA ligase. Aliquots were taken at the indicated times, subjected to TLC (a, b) and quantified in an InstantImager (c).

agreement with previous results indicating that ATP is the preferred substrate for the RNA joining reaction [18].

The ability of 3 mM P₃ or P₄ or P₁₅ to act as adenylyl acceptors in the presence of 1 mM ATP was measured by HPLC. In a control mixture in the absence of polyphosphate,

transformation of ATP into Ap₄A was observed (Fig. 4A.a). In the presence of ATP + P₃, synthesis of p₃A, Ap₄A and of very small amounts of Ap₅A took place (Fig. 4A.b), reflecting the following set of reactions: ATP + P₃ → p₃A; and p₃A + ATP → Ap₄A. With P₄ as cofactor, only minor quantities of p₄A, along with Ap₄A, were obtained (Fig. 4A.c).

The commercial mixture of polyphosphates described as P_{15} was not a substrate for the reaction: in fact, these higher polyphosphates behaved as inhibitors of the reaction as no appreciable synthesis of Ap_4A was observed (Fig. 4A,d). The identity of the synthesized p_4A was investigated in an aliquot of the reaction mixture containing ATP + P_1 (Fig. 4B,a). The presumptive p_4A : (a) eluted with a standard of p_4A ; (b) was degraded by alkaline phosphatase to adenosine (and inosine, as a result of the adenosine deaminase contaminating the commercial preparations of alkaline phosphatase) (Fig. 4B,b); and (c) was hydrolyzed to AMP following treatment with snake venom phosphodiesterase (Fig. 4B,c).

Nucleotides as acceptors of AMP from the E-AMP complex. The K_m value described for ATP in the enzyme adenylation reaction was 12 μM [18]. The K_m value for ATP as acceptor of AMP was determined in the presence of 0.5, 1, 2, 4 and 6 mM ATP and fixed (1 mM) free Mg^{2+} . In these conditions the K_m found for ATP was 1.25 mM and the k_{cat} for Ap_4A synthesis was 0.055 s^{-1} . Hence, the synthesis of Ap_4N was approached in the presence of low concentration, 0.02 mM, of [α - ^{32}P]ATP (enough to form the E-AMP complex, but only marginally enough to form Ap_4A), 0.8 U of T4 RNA ligase and 4 mM each of XTP, dGTP, GTP, dCTP, CTP, ADP, ddATP. After 15 min incubation, the products formed were separated by TLC and the radioactivity counted. The relative rates of synthesis measured for the corresponding dinucleotides were, respectively: Ap_4X (100); Ap_4dG (74); Ap_4G (49); Ap_4dC (23); Ap_4C (9); Ap_3A (5); Ap_4ddA (1). In the presence of 0.02 mM ATP and 4 mM P_3 p_4A was formed at a rate about double of that obtained for Ap_4X . The identity of these dinucleotides was assessed by their insensitivity to alkaline phosphatase, position in the TLC plate and, when possible, by their UV spectra (see below).

ATP γ S as a substrate of T4 RNA ligase. Because of its molecular characteristics, ATP γ S has been widely used as substrate of firefly luciferase using luciferin (LH2) as cofactor [15]. ATP γ S is a good adenylyl donor for formation of the E-LH2-AMP complex (as it contains an intact α -phosphate within a P_3 chain) and a poor adenylyl acceptor (as it does not have an intact terminal PP_i). Because of these properties, this nucleotide has been used for the selective synthesis of Ap_4N by luciferase using ATP γ S and NTP (good AMP acceptors). Based on the above, ATP γ S was tested as substrate of T4 RNA ligase, using three reaction mixtures containing 2 mM ATP; ATP + XTP (2 mM each) or ATP γ S + XTP (2 mM each) (Fig. 5). In the first case (considered as a control) complete conversion of ATP into Ap_4A took place; small amounts of a presumptive Ap_3A were also observed (Fig. 5a). Synthesis of Ap_4A , Ap_4X and residual

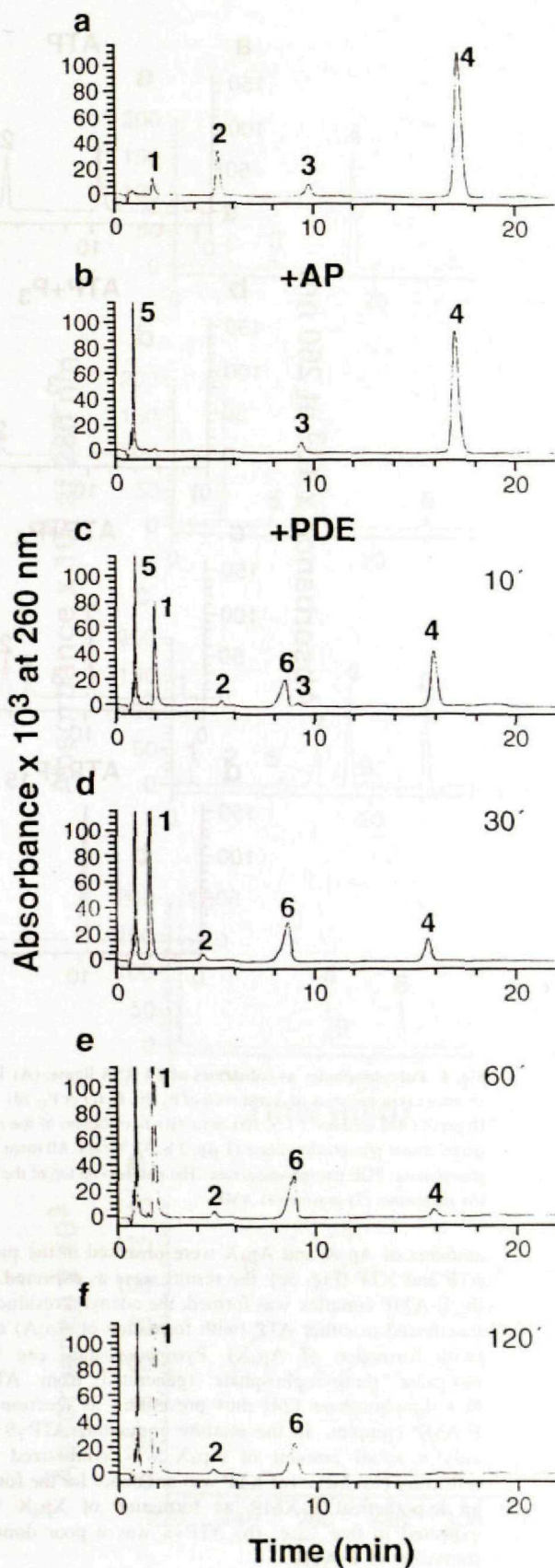


Fig. 3. Synthesis and characterization of Ap_4A by T4 RNA ligase. (a) A reaction mixture (0.05 mL) containing 10 U of RNA ligase and 2 mM unlabeled ATP was incubated overnight and an aliquot (0.01 mL) subjected to HPLC as described in the text. Peaks corresponding to AMP, ADP and presumptive Ap_3A and Ap_4A were detected. (b) Another aliquot (0.04 mL) of the reaction mixture was treated with 1 μg of alkaline phosphatase for 2 h, heated in boiling water for 30 s, chromatographed and analyzed by HPLC, (using a Hypersil ODS column, 2.1×100 mm). The peaks corresponding to AMP and ADP were transformed into adenosine while the presumptive Ap_3A and Ap_4A remain unchanged. The remaining mixture (0.03 mL) was treated with snake venom phosphodiesterase (0.4 μg) for 10 (c), 30 (d), 60 (e) and 120 (f) min and analyzed by HPLC in the same conditions as above. AP, alkaline phosphatase; PDE, snake venom phosphodiesterase. The numbers on top of the peaks correspond to the following compounds: (1) AMP; (2) ADP; (3) Ap_3A ; (4) Ap_4A ; (5) Ado; (6) ATP.

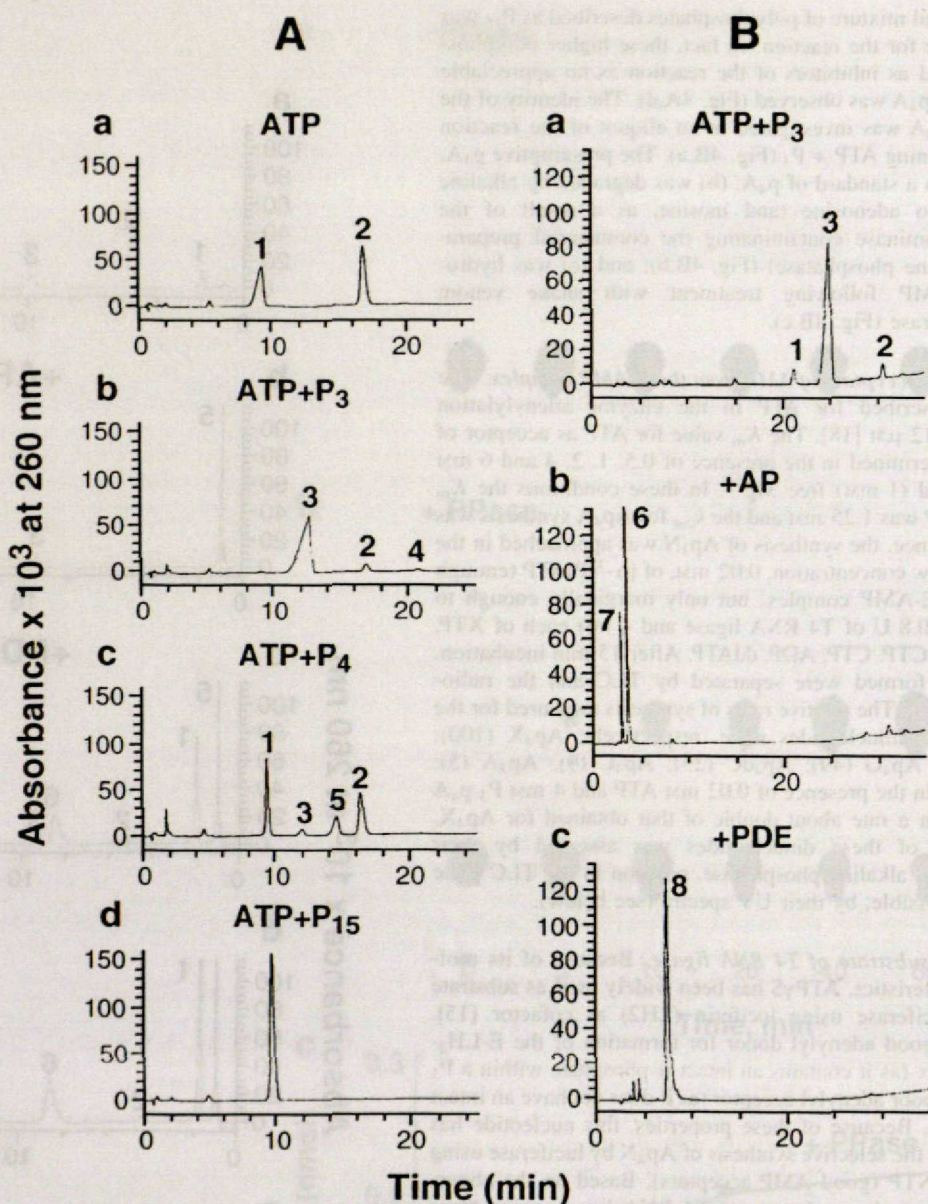


Fig. 4. Polyphosphates as substrates of T4 RNA ligase. (A) The enzyme was incubated in the presence of 1 mM ATP, desalted pyrophosphatase and in the absence (a) or presence of 3 mM each of P₃ (b), P₂ (c) or P₁₅ (d). After overnight incubation at room temperature, the mixtures were analyzed by HPLC (using a Hypersil ODS column, 2.1 × 100 mm). (B) Two aliquots of the reaction mixture (a) were treated either with alkaline phosphatase (5 µg, 2 h, 37 °C) (b) or with snake venom phosphodiesterase (1 µg, 2 h, 37 °C) (c). All three samples were analyzed by HPLC (using a Hypersil ODS column, 4.6 × 100 mm). AP, alkaline phosphatase; PDE, phosphodiesterase. The numbers on top of the peaks correspond to the following compounds: (1) ATP; (2) Ap₂A; (3) p₃A; (4) Ap₃A; (5) p₅A; (6) adenosine; (7) inosine; (8) AMP.

amounts of Ap₃A and Ap₃X were observed in the presence of ATP and XTP (Fig. 5c); the results were as expected, i.e. once the E-AMP complex was formed, the adenylyl residue could be transferred to either ATP (with formation of Ap₄A) or to XTP (with formation of Ap₃X). Pyrophosphatase can hydrolyze inorganic thiopyrophosphate (generated from ATPγS) to Pi + thiophosphate [24] thus preventing its reaction with the E-AMP complex. In the mixture containing ATPγS and XTP only a small amount of Ap₄X was synthesized (Fig. 5b), reflecting two facts: (a) XTP was not donor for the formation of an hypothetical E-XMP, as formation of Xp₄X would be expected in that case; (b) ATPγS was a poor donor for the formation of E-AMP.

The nature of the synthesized products was analyzed in several ways: (a) by their chromatographic position – in our experimental conditions, xanthine derivatives are retarded with respect to adenine derivatives of equal structure and number of phosphates; (b) by treatment with alkaline phosphatase of the mixture containing ATP and XTP – only peaks corresponding to Ap₄X, Ap₂A and to presumptive Ap₃X remained (Fig. 5d); and (c) by UV absorption spectra of Ap₂X (or Ap₃A) compared with that of Ap₄X (or Ap₃X) or XTP (Fig. 5e).

The relative amount of Ap₂X synthesized in the presence of (ATP + XTP) or (ATPγS + XTP) was 100 and 10, respectively.

The potential of ATP γ S to adenylylate RNA ligase was further assayed in the experiment described below.

Synthesis of diadenosine triphosphate catalyzed by T4 RNA ligase

A clue to the synthesis of Ap₃A by T4 RNA ligase was obtained in previous assays (Figs 3b and 5a). However, due to the recent interest of diadenosine triphosphate as substrate of a potential tumor suppressor gene (the *FHIT* gene [4–7]), the synthesis of Ap₃A was further assessed by HPLC in reaction mixtures containing 1 mM ATP + 2 mM ADP (Fig. 6a) or 2 mM ATP γ S + 2 mM ADP (Fig. 6b). After an overnight incubation, the mixtures were treated with alkaline phosphatase (Fig. 6c,d), and the remaining peaks corresponded to Ap₃A and Ap₄A. The nature of the presumptive Ap₃A was further confirmed by treatment with dinucleoside triphosphatase (purified from rat liver [6]), which gave ADP and AMP as products of hydrolysis of Ap₃A (results not shown).

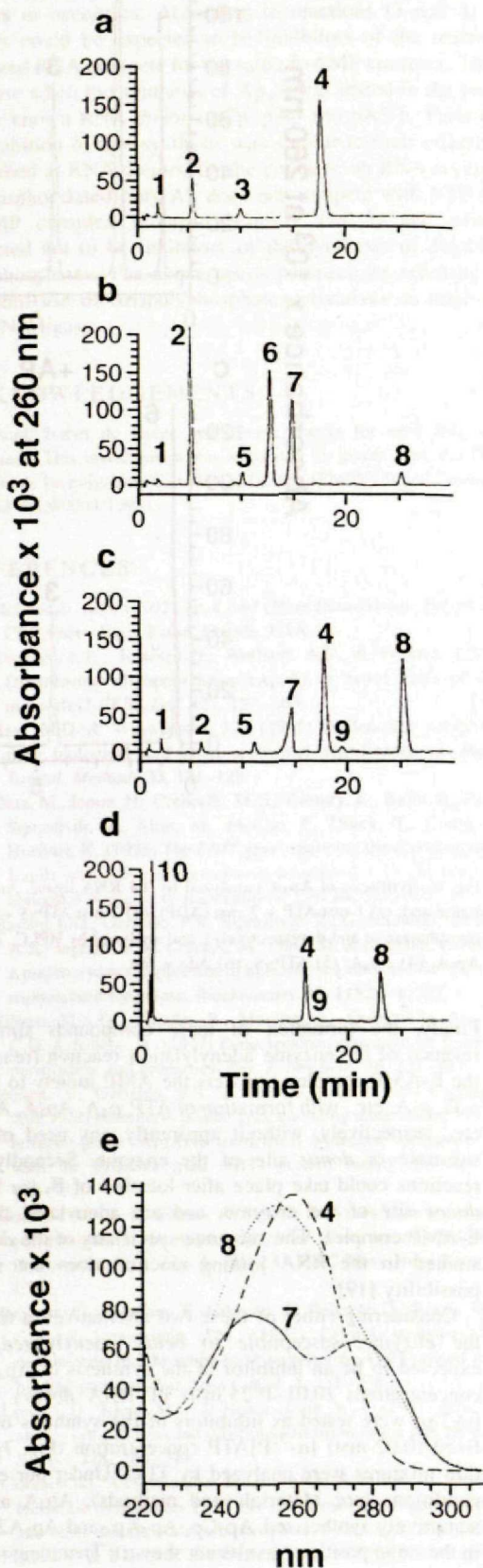
In the presence of 1 mM ATP + 2 mM ADP (Fig. 6a), the relative amounts of Ap₄A and Ap₃A formed were 100 and 130, respectively. As above, ATP γ S was not good donor of AMP for the synthesis of Ap₃A from ADP: the Ap₃A synthesized in the presence of ATP γ S + ADP was only 25% of that formed in the presence of ATP + ADP.

Inhibition of the synthesis of Ap₄G by T4 RNA ligase donors

In the terminology at use for T4 RNA ligase [19,25], the 5'-phosphoryl and the 3'-OH terminated portions of RNA (or similar molecules) are called the RNA *donor* and the RNA *acceptor*, respectively (shown in *italics*). Three active sites are considered in the enzyme: the ATP site, the *donor* site and the *acceptor* site. Although the term *donor* refers more properly to the potentiality of being RNA *donor*, the 5'-P end of RNA is firstly acting as AMP acceptor from the E-AMP complex. Only after formation of E-AppRNA takes place, the RNA behaves as *donor*. In a strict sense, the term *acceptor* could be applied equally well to the modified 5'-P end of RNA, as this end can also be viewed as accepting the 3'-OH terminal RNA. It seems to us curious that this terminology has not been developed for the very similar reactions catalyzed by T4 DNA ligase. In the context of this work, it seems more appropriate to name the three reactions catalyzed by T4 RNA ligase as: enzyme adenylylation, RNA adenylylation and RNA joining.

The substrate specificity of the ATP binding site can be directly determined [18] and this work. The substrate specificity of the 5'-P-RNA *donor* in the RNA adenylylation reaction [4] has been indirectly determined by studying the overall RNA joining reaction [19]. A ribonucleoside 3',5'-bisphosphate (pCp > pAp > pA2'p) was much better *donor* than a nucleoside 5'-monophosphate (pA or pC). Related to the mechanism of reaction of this enzyme, the synthesis of p₄A (from ATP and P₃) or Ap₄N (from ATP and NTP) can be interpreted in two ways.

Fig. 5. ATP γ S as substrate of T4 RNA ligase. Among other components (see Materials and methods), the reaction mixtures contained 10 U RNA ligase and: (a) 2 mM ATP; (b) 2 mM ATP γ S + 2 mM XTP; (c) 2 mM ATP + 2 mM XTP. After an overnight incubation, mixture (c) was further treated with 1 μ g alkaline phosphatase for 2 h at 37 °C (d). Analysis was performed by HPLC. UV spectra corresponding to Ap₄A (4), or Ap₄X (8) or XTP (7) are indicated in part (e) of the Fig. The spectra of the presumptive Ap₃A: (3) and Ap₃X (9) were identical to the spectra of Ap₄A (4) and Ap₄X (8), respectively. The numbers on top of the peaks correspond to the following compounds: (1) AMP; (2) ADP; (3) Ap₃A; (4) Ap₄A; (5) XDP; (6) ATP γ S; (7) XTP; (8) Ap₄X; (9) Ap₃X; (10) Ado + Ino.



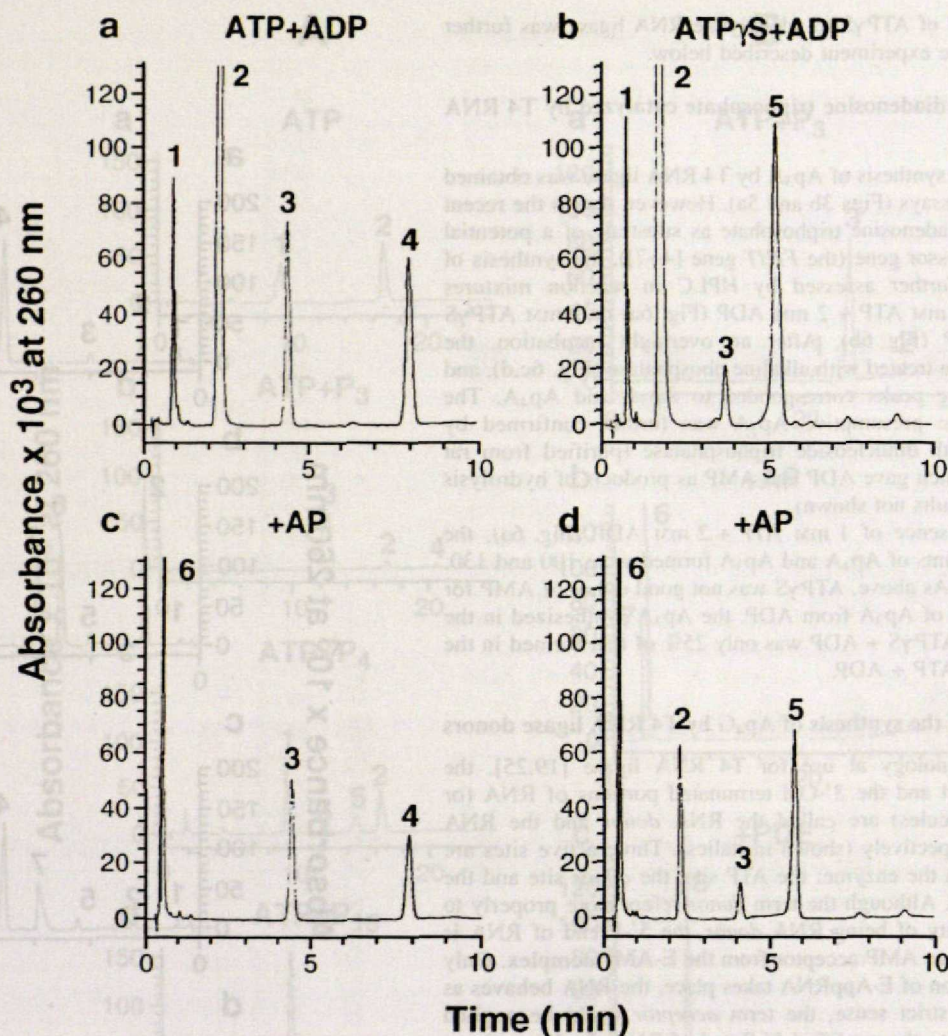


Fig. 6. Synthesis of Ap_3A catalyzed by T4 RNA ligase. Among other components (see Materials and methods), the reaction mixtures contained 10 U RNA ligase and: (a) 1 mM ATP + 2 mM (ADP); (b) 2 mM $\text{ATP}\gamma\text{S}$ + 2 mM ADP. After overnight incubation, aliquots of the mixtures were treated with 1 μg of alkaline phosphatase (c and d, respectively), and analyzed by HPLC. The numbers on top of the peaks correspond to the following compounds: (1) AMP; (2) ADP; (3) Ap_3A ; (4) Ap_4A ; (5) $\text{ATP}\gamma\text{S}$; (6) Ado + Ino.

Firstly, the formation of these compounds simply implies reversal of the enzyme adenylation reaction (reaction 3), i.e. the E-AMP complex transfers the AMP moiety to P_2 , P_3 , p_3A , p_3G , p_2A , etc., with formation of ATP, p_4A , Ap_4A , Ap_4G , Ap_3A , etc., respectively, without apparently any need of the donor substrate or donor site of the enzyme. Secondly, the same reactions could take place after location of P_3 (or NTP) in the donor site of the enzyme, and are adenylated there by the E-AMP complex. The substrate specificity of the donor site, as studied in the RNA joining reaction does not support this possibility [19].

Considering either of these two alternatives, a true donor of the enzyme, susceptible to being adenylated, could be expected to be an inhibitor of the synthesis of Ap_4A . Variable concentrations (0.01–0.25 mM) of RNA donors (pCp, pAp, $\text{pA}2'\text{p}$) were tested as inhibitors of the synthesis of Ap_4A at a fixed (0.02 mM) $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ concentration (Fig. 7). The reaction mixtures were analyzed by TLC. Under our experimental conditions (see Materials and methods), Ap_4A and the presumptively synthesized Ap_2Cp , Ap_2Ap , and $\text{Ap}_2\text{A}2'\text{p}$ migrated in the same position (results not shown). Treatment with alkaline

phosphatase before separation by TLC of the products formed, allowed the separation of Ap_4A from Ap_2Cp and Ap_2A . The results obtained with pAp as inhibitor of the synthesis of Ap_4A are shown in Fig. 7a. Similar experimental evidence was obtained with pCp and $\text{pA}2'\text{p}$ (results not shown). From these experiments, the inhibition of the synthesis of Ap_4A by the three RNA donors tested was calculated (Fig. 7b). The best inhibitor of the synthesis of Ap_4A was pCp followed by pAp and $\text{pA}2'\text{p}$, in good correlation with their effectiveness as substrate donors of T4 RNA ligase [19].

In a similar experiment, a fixed concentration (0.02 mM) of pCp, pAp, $\text{pA}2'\text{p}$ was added to reaction mixtures containing 0.02 mM $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$. In these conditions, the initial rates of synthesis of Ap_2Cp , Ap_2Ap and $\text{Ap}_2\text{A}2'\text{p}$ were 12.5, 3.5 and 0.15 $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ protein, respectively, whereas the initial rate of synthesis of Ap_4A was 1.06 (with pCp and pAp) and 1.2 $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ (with $\text{pA}2'\text{p}$). In the absence of added nucleoside bisphosphate, the rate of synthesis of Ap_4A from ATP was 1.25 $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$. Altogether, these results are in agreement with those presented in Fig. 7. On the other side, dephosphorylated poly(A) (2, 6, and 20 μg) did not have an

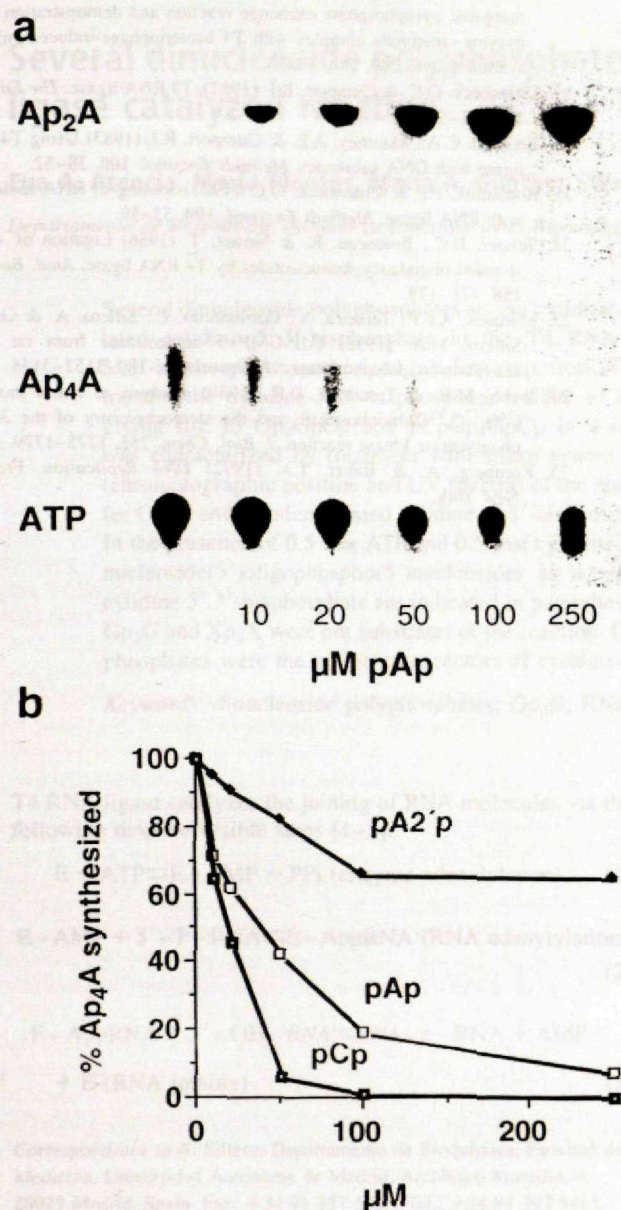


Fig. 7. Inhibition of the synthesis of Ap_4A by T4 RNA ligase donors. The reaction mixtures contained a fixed amount (0.02 mM) of [α - ^{32}P]ATP, other components as indicated in Materials and methods, 2 U T4 RNA ligase and variable concentrations of pAp , $pA_2'p$ or pCp . After 60 min incubation, the reaction mixtures were treated with 1 μg alkaline phosphatase for 1 h at 37 °C, subjected to TLC and the radioactivity corresponding to Ap_4A , and to Ap_2A or Ap_3A quantified in an InstantImager. (a) Autoradiography of the TLC plate of the experiment performed with pAp as inhibitor; (b) relative inhibition of the synthesis of Ap_4A by pAp , $pA_2'p$ or pCp .

appreciable effect on the synthesis of Ap_2A analyzed in the same experimental conditions as above.

Conclusions

As shown in this paper, T4 RNA ligase catalyzes the transfer of AMP from the E-AMP complex to diverse compounds, generating the products indicated between parentheses: ATP (Ap_4A); NTP (Ap_3N); P_3 or P_4 (p_4A or p_5A); ADP (Ap_3A). In our view these reactions can be interpreted as a reversion of the

first step of reaction [3], i.e. $ATP + E \rightleftharpoons E-AMP + PP_i$, where diverse polyphosphate derivatives can replace PP_i . The above reaction is favoured when the generated PP_i is removed by pyrophosphatase, and it does not require the presence of RNA donors or acceptors. According to reactions (3 and 4), RNA donors could be expected to be inhibitors of the reaction, as NTP and RNA compete for the same E-AMP complex. That was the case when the synthesis of Ap_4A was tested in the presence of the known RNA donors, pCp , pAp and $pA_2'p$. Their degree of inhibition of that synthesis was similar to their effectiveness described as RNA donors. By the contrary, an RNA acceptor, as dephosphorylated poly(A), does not compete with NTP for the E-AMP complex (compare Eqns 3 and 5) and would be expected not to be inhibitory of the synthesis of dinucleoside polyphosphates. The above opens perspectives referring to the potential use of (tri)polyphosphate derivatives as inhibitors of T4 RNA ligase.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Isabel de Diego and Teresa Garcia for very able technical assistance. This investigation was supported by grants from the Dirección General de Investigación Científica y Técnica (PM95/13) and Comunidad de Madrid (08.9/0004/1998).

REFERENCES

- McLennan, A.G. (1992) *Ap₄A And Other Dinucleoside Polyphosphates*. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
- Kisselev, L.L., Justesen, J., Wolfson, A.D. & Frolova, L.Y. (1998) Diadenosine oligophosphates (Ap_nA), a novel class of signaling molecules? *FEBS Lett.* **427**, 157–163.
- Baxi, M.D. & Vishwanatha, J.K. (1995) Diadenosine polyphosphates: their biological and pharmacological significance. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **33**, 121–128.
- Ohta, M., Inoue, H., Cotticelli, M.G., Kastury, K., Baffa, R., Palazzo, J., Siprashvili, Z., Mori, M., McCue, P., Druck, T., Croce, C.M. & Huebner, K. (1996) The *FHIT* gene, spanning the chromosome 3p14.2 fragile site and renal carcinoma-associated t (3; 8) breakpoint, is abnormal in digestive tract cancers. *Cell* **84**, 587–597.
- Barnes, L.D., Garrison, P.N., Siprashvili, Z., Guranowski, A., Robinson, A.K., Ingram, S.W., Croce, C.M., Ohta, M. & Huebner, K. (1996) *Fhit*, a putative tumor suppressor in humans, is a dinucleoside 5'-5'- P^1 , P^2 -triphosphate hydrolase. *Biochemistry* **35**, 11529–11535.
- Sillero, M.A.G., Villalba, R., Moreno, A., Quintanilla, M., Lobatón, C.D. & Sillero, A. (1977) Dinucleosidetriphosphatase from rat liver: purification and properties. *Eur. J. Biochem.* **76**, 331–337.
- Huang, Y., Garrison, P.N. & Barnes, L.D. (1995) Cloning of the *Schizosaccharomyces pombe* gene encoding diadenosine 5'-5'- P^1 , P^2 -tetraphosphate (Ap_4A) asymmetrical hydrolase: sequence similarity with the histidine triad (HIT) protein family. *Biochem. J.* **312**, 925–932.
- Guranowski, A. & Sillero, A. (1992) Enzymes cleaving dinucleoside polyphosphates. In *Ap₄A and Other Dinucleoside Polyphosphates* (McLennan, A.G., ed.), pp. 81–133. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
- Brenner, C., Garrison, P., Gilmour, J., Peisach, D., Ringe, D., Petsko, G.A. & Lowenstein, J.M. (1997) Crystal structures of HIT demonstrate that histidine triad proteins are GalT-related nucleotide-binding proteins. *Nat. Struct. Biol.* **4**, 231–238.
- Lima, C.D., Klein, M.G. & Hendrickson, W.A. (1997) Structure-based analysis of catalysis and substrate definition in the HIT protein family. *Science* **278**, 286–290.
- Guranowski, A.G., Günther Sillero, M.A. & Sillero, A. (1996) Firefly luciferase synthesizes P^1 , P^2 -bis (5'-adenosyl) tetraphosphate (Ap_4A) and other dinucleoside polyphosphate. *FEBS Lett.* **271**, 215–218.
- Plateau, P. & Blanquet, S. (1992) Synthesis of Np_nN ($n=3$ or 4) *in vitro* and *in vivo*. In *Ap₄A And Other Dinucleoside Polyphosphates*

- (McLennan, A.G., ed.), pp. 63–79. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
- Guranowski, A., Günther Sillero, M.A. & Sillero, A. (1994) Adenosine 5'-tetraphosphate and adenosine 5'-pentaphosphate are synthesized by yeast acetyl coenzyme A synthetase. *J. Bacteriol.* **176**, 2986–2990.
 - Fontes, R., Günther Sillero, M.A. & Sillero, A. (1998) Acyl-CoA synthetase from *Pseudomonas fragi* catalyzes the synthesis of adenosine 5'-polyphosphates and dinucleoside polyphosphates. *J. Bacteriol.* **180**, 3152–3158.
 - Ortiz, B., Sillero, A. & Günther Sillero, M.A. (1993) Specific synthesis of adenosine (5') tetraphospho (5') nucleoside and adenosine (5') oligophospho (5') adenosine ($n \geq 4$) catalyzed by firefly luciferase. *Eur. J. Biochem.* **212**, 263–270.
 - Madrid, O., Martín, D., Atencia, E.A., Sillero, A. & Günther Sillero, M.A. (1998) T4 DNA ligase synthesizes dinucleoside polyphosphates. *FEBS Lett.* **433**, 283–286.
 - Harnett, S.P., Lowe, G. & Tansley, G. (1985) A stereochemical study of the mechanism of activation of donor oligonucleotides by RNA ligase from bacteriophage T4 infected *Escherichia coli*. *Biochemistry* **24**, 7446–7449.
 - Cranston, J.W., Silber, R., Malathi, V.G. & Hurwitz, J. (1974) Studies on ribonucleic acid ligase. Characterization of an adenosine triphosphate-inorganic pyrophosphate exchange reaction and demonstration of an enzyme-adenylate complex with T4 bacteriophage-induced enzyme. *J. Biol. Chem.* **249**, 7447–7456.
 - Uhlenbeck, O.C. & Gumport, R.I. (1982) T4 RNA ligase. *The Enzymes* **15B**, 31–58.
 - Brennan, C.A., Manthey, A.E. & Gumport, R.I. (1983) Using T4 RNA ligase with DNA substrates. *Methods Enzymol.* **100**, 38–52.
 - Romaniuk, P.J. & Uhlenbeck, O.C. (1983) Joining of RNA molecules with RNA ligase. *Methods Enzymol.* **100**, 52–59.
 - Tessier, D.C., Brouseau, R. & Vernet, T. (1986) Ligation of single-stranded oligodeoxyribonucleotides by T4 RNA ligase. *Anal. Biochem.* **158**, 171–178.
 - Marques, A.F.P., Teixeira, N., Gambaretto, C., Sillero, A. & Günther Sillero, M.A. (1998) IMP-GMP 5'-nucleotidase from rat brain activation by polyphosphates. *J. Neurochem.* **180**, 3152–3158.
 - Webb, M.R. & Trentham, D.R. (1980) Analysis of chiral inorganic [^{16}O , ^{17}O , ^{18}O]thiophosphate and the stereochemistry of the 3-phosphoglycerate kinase reaction. *J. Biol. Chem.* **255**, 1775–1779.
 - Kornberg, A. & Baker, T.A. (1992) *DNA Replication*. Freeman, New York.

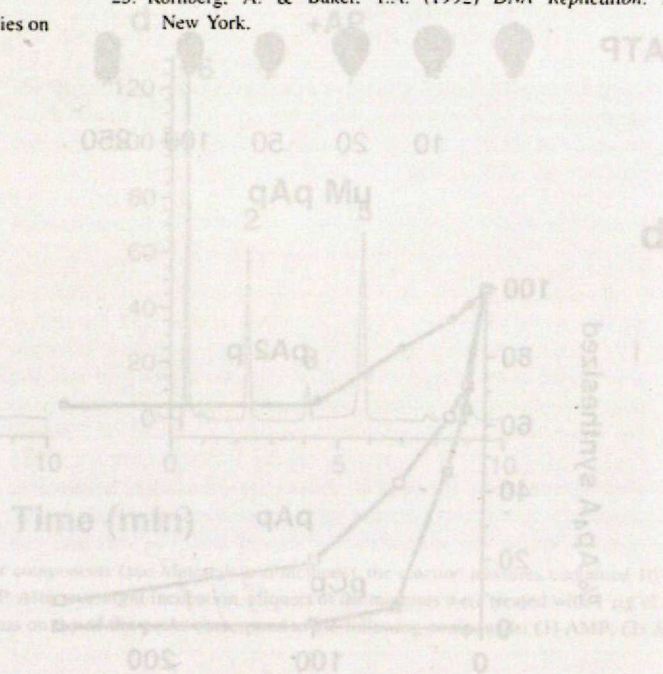


Fig. 1. Kinetics of the synthesis of dinucleoside polyphosphates by T4 RNA ligase. The reaction was carried out in the presence of 100 μM ATP, 10 μM T4 RNA ligase, and 10 μM pAp. The reaction was stopped at the indicated times by the addition of 100 μM EDTA. The products were separated by HPLC and quantified. The data represent the mean \pm S.D. of three independent experiments.

Several dinucleoside polyphosphates are acceptor substrates in the T4 RNA ligase catalyzed reaction

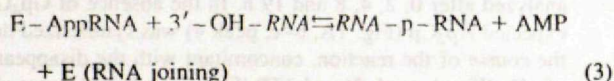
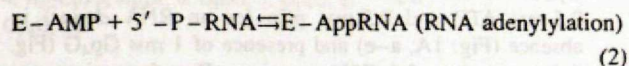
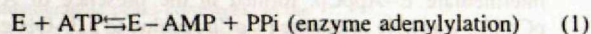
Eva A. Atencia, María Montes, María A. Günther Sillero and Antonio Sillero

Departamento de Bioquímica, Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols, UAM/CSIC, Facultad de Medicina, Madrid, Spain

Several dinucleoside polyphosphates accept cytidine-3',5'-bisphosphate from the adenylylated donor 5'-adenylylated cytidine 5',3'-bisphosphate in the T4 RNA ligase catalyzed reaction. The 5'-adenylylated cytidine 5',3'-bisphosphate synthesized in a first step, from ATP and cytidine-3',5'-bisphosphate, is used as a substrate to transfer the cytidine-3',5'-bisphosphate residue to the 3'-OH group(s) of diguanosine tetraphosphate (Gp₄G) giving rise to Gp₄GpCp and pCpGp₄GpCp in a ratio of ≈ 10 : 1, respectively. The synthesized Gp₄GpCp was characterized by treatment with snake venom phosphodiesterase and alkaline phosphatase and analysis (chromatographic position and UV spectra) of the reaction products by HPLC. The apparent *K_m* values measured for Gp₄G and 5'-adenylylated cytidine 5',3'-bisphosphate in this reaction were ≈ 4 mM and 0.4 mM, respectively. In the presence of 0.5 mM ATP and 0.5 mM cytidine-3',5'-bisphosphate, the relative efficiencies of the following nucleoside(5')oligophospho(5')nucleosides as acceptors of cytidine-3',5'-bisphosphate from 5'-adenylylated cytidine 5',3'-bisphosphate are indicated in parentheses: Gp₄G (100); Gp₅G (101); Ap₄G (47); Ap₄A (39). Gp₂G, Gp₃G and Xp₄X were not substrates of the reaction. Dinucleotides containing two guanines and at least four inner phosphates were the preferred acceptors of cytidine-3',5'-bisphosphate at their 3'-OH group(s).

Keywords: dinucleoside polyphosphates; Gp₄G; RNA acceptors; T4 RNA ligase.

T4 RNA ligase catalyzes the joining of RNA molecules via the following three reversible steps [1–5]:



The 5'-P and the 3'-OH ends of the RNA are usually called the RNA *donor* and RNA *acceptor*, respectively [3,6,7].

We have recently shown that, in the presence of pyrophosphatase, RNA ligase transfers the adenylyl moiety of the E-AMP complex to a nucleoside triphosphate (NTP) giving rise to a dinucleoside tetraphosphate [8]:



The first step (reaction 1) requires ATP or dATP for the formation of the E-(d)AMP complex [2]. In contrast, the substrate specificity of reaction (4) is rather broad and the E-AMP complex can adenylylate several phosphate-containing compounds with the formation of the following nucleotides: p₄A (from P₃), Ap₃A (from ADP), Ap₄A (from ATP) or Ap₄N (from NTP) [8]. Ribonucleoside 3'-(2')-5'-bisphosphates, such as cytidine-3',5'-bisphosphate (pCp), pAp or pA2'p, which can accept the adenylyl moiety of the E-AMP complex to form 5'-adenylylated cytidine 5',3'-bisphosphate (Ap₂Cp) or Ap₂Ap [3,9,10], are inhibitors of Ap₄N synthesis as they compete with NTP for the same E-AMP complex [8].

It has previously been reported [3,9–11] that the minimal substrate to be adenylylated by T4 RNA ligase in reaction (2) was a nucleoside 3',5'-bisphosphate and the minimal acceptor, in the joining reaction (3), was a trinucleoside diphosphate (NpNpN) with free hydroxyl groups at both its 3' and 5'-ends.

Because a dinucleoside polyphosphate resembles the 3'-OH end of RNA (Fig. 2), we wondered whether it could behave as an RNA analog in reaction (3). This possibility was explored using pCp as an RNA *donor* and several dinucleoside polyphosphates as RNA *acceptors*. Of the various dinucleoside polyphosphates tested, diguanosine tetraphosphate and pentaphosphate (Gp₄G and Gp₅G) were the best acceptors of pCp, followed by Ap₄G and Ap₂A, yielding preferentially Gp₄GpCp, Gp₅GpCp, Ap₄GpCp + pCpAp₄G and Ap₄ApCp, respectively.

Correspondence to: A. Sillero, Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid, Arzobispo Morcillo, 4, 28029 Madrid, Spain. Fax: +34 91 397 5353, Tel.: +34 91 397 5413, E-mail: antonio.sillero@uam.es.

Abbreviations: *Ap₃A, adenosine(5')triphospho(5')adenosine or diadenosine triphosphate; Ap₄A, adenosine(5')tetraphospho(5')adenosine; Ap₅A, adenosine(5')pentaphospho(5')adenosine; Ap₂Cp, 5'-adenylylated cytidine 5',3'-bisphosphate; Ap₄G, adenosine(5')tetraphospho(5')guanosine; Ap₄N, adenosine(5')tetraphospho(5')nucleoside; Ap₄X, adenosine(5')tetraphospho(5')xanthosine; ATPγS, adenosine-5'-γ-thiotriphosphate; CpG, cytidyl(3'→5') guanosine; GpC, guanylyl(3'→5') cytidine; Gp₂G, guanosine(5')diphospho(5')guanosine; Gp₃G, guanosine(5')triphospho(5')guanosine; Gp₄G, diguanosine tetraphosphate; Gp₄GpCp, Gp₄G(3')pCp; Gp₅G, guanosine(5')pentaphospho(5')guanosine; Np₄N, nucleoside(5')oligophospho(5')nucleoside; P₃, tripolyphosphate; p₄A, adenosine-5'-tetraphosphate; pCp, cytidine-3',5'-bisphosphate; pCpGp₄GpCp, p(3')C(5')p(3')Gp₄G(3')pCp; Xp₄X, xanthosine(5')tetraphospho(5')xanthosine.

Enzymes: alkaline phosphatase (EC 3.1.3.1); DNA ligase (AMP forming) (EC 6.5.1.1); DNA ligase (AMP-forming, NMN-forming) (EC 6.5.1.2); firefly luciferase (EC 1.13.12.7); inorganic pyrophosphatase (EC 3.6.1.1); RNA ligase (EC 6.5.1.3).

(Received 14 December 1999, accepted 19 January 2000)

Interestingly, Gp₂G, Gp₃G and Xp₄X were not substrates of the reaction.

MATERIALS AND METHODS

Materials

T4 RNA ligase was purchased from Boehringer Mannheim (1449478; lot numbers: 84064027, 85014020, 85014021, 85123921). Electrophoresis of these preparations on polyacrylamide gels, in the presence of SDS, presented a unique band (when stained with Coomassie Brilliant Blue) with an apparent molecular mass of 42 kDa. One unit (U) is the enzyme activity required to catalyze the formation of 1 nmol of [5-³²P]rA₁₂₋₁₈ into a phosphatase-resistant form in 30 min at 37 °C. Alkaline phosphatase (grade I) (EC 3.1.3.1), phosphodiesterase from *Crotalus durissus* (EC 3.1.4.1) and yeast inorganic pyrophosphatase (EC 3.6.1.1) were obtained from Boehringer Mannheim. Ap_nA (*n* = 2–5) Gp₃G and Gp₅G were from Sigma. Gp₂G and Gp₄G were purified from *Artemia* [12]. Purified Gp₄G contained 8% Gp₃G. pCp was from Pharmacia. Cytidylyl (3'→5') guanosine (CpG) was from ICN Biomedicals GmbH. Guanylyl (3'→5') cytidine (GpC) was from Sigma. Xp₄X was prepared by deamination of Gp₄G, as described for Gp₃G, and purified by ion-exchange chromatography [13]. Inorganic pyrophosphatase was desalted as described previously [14]. HPLC was carried out in a Hewlett Packard chromatograph (model 1090), with a diode array detector, commanded by an HPLC ChemStation.

Synthesis of Gp₄GpCp or Gp₅GpCp

Unless stated otherwise the reaction mixtures contained, in a volume of 0.03–0.05 mL, 50 mM Tris/HCl (pH 7.4), 1 mM dithiothreitol, 5 mM MgCl₂, 0.02 mg·mL⁻¹ BSA, 1 U·mL⁻¹ desalted pyrophosphatase, T4 RNA ligase, ATP, pCp and other nucleotides as indicated. After incubation at 30 °C, 0.01 mL aliquots of the reaction mixtures were transferred to 0.14 mL of water and kept at 95 °C for 1.5 min. After chilling, the mixtures were filtered and a 0.05-mL aliquot was injected into a Hypersil ODS column (2.1 × 100 mm). Elution was performed at a flow rate of 0.5 mL·min⁻¹ with a 20-min linear gradient (5–30 mM) of sodium phosphate (pH 7.5) in 20 mM tetrabutylammonium bromide/20% methanol (buffer A) followed by a 10-min linear gradient (30–100 mM) of sodium phosphate in buffer A. In the particular case of Fig. 6E, the column was additionally eluted for 30 min with 100 mM of sodium phosphate in buffer A.

Purification and characterization of Gp₄GpCp

Purification. The reaction mixture (0.3 mL) contained 0.5 mM ATP, 0.5 mM pCp, 0.6 mM Gp₄G, 50 U of T4 RNA ligase and other components as indicated. After 22 h incubation at 30 °C the reaction mixture was heated for 2 min at 95 °C, diluted threefold with water and 0.05-mL aliquots were applied to a MonoQ column (5 × 50 mm) equilibrated in 0.5 M NH₄HCO₃ (pH 8.0). After sample application, the column was washed for 3 min with the same buffer at a flow rate of 1 mL·min⁻¹; retained compounds were then eluted with a 15-min gradient (0.5–1 M) of NH₄HCO₃. Fractions of interest were collected and concentrated by lyophilization.

Characterization: alkaline phosphatase and phosphodiesterase treatment of Gp₄GpCp. A reaction mixture (0.21 mL) containing 0.057 A₂₆₀ units of Gp₄GpCp, 25 mM

Tris/HCl, pH 7.5 and 1 mM MgCl₂ was incubated in the presence of 1.5 U of alkaline phosphatase for 30 min at 37 °C. Phosphatase was inactivated by heating at 100 °C for 5 min and a 0.1-mL aliquot was taken and analyzed by HPLC (Fig. 2B). Two micrograms of snake venom phosphodiesterase were added to the residual mixture, incubated at 37 °C for 30 min and analyzed by HPLC (Fig. 2C). A reaction mixture (0.21 mL) containing Gp₄GpCp, and other components as above, was incubated in the presence of 1 µg of phosphodiesterase for 30 min at 37 °C. Phosphodiesterase was inactivated by heating at 100 °C for 5 min and a 0.1-mL aliquot was analyzed by HPLC (Fig. 2D). Alkaline phosphatase (1.5 units) was added to the residual reaction mixture, incubated for 30 min at 37 °C and analyzed (Fig. 2E).

Nature of the chromatographic peaks

In order to facilitate their location and characterization, all the chromatographic peaks shown in Figs 1, 2, 4–6 have been named in order of appearance using the following nomenclature: 1, AMP; 2, pCp; 3, ATP; 4, Ap₂Cp; 5 Ap₄A; 6 Gp₃G; 7, Gp₄G; 8, Gp₄GpCp; 9, Gp₄GpC; 10, pC; 11, pG; 12, pppGpCp; 13, Guo; 14, GpC; 15, pCpGp₂GpCp; 16 CpGp₄GpC; 17, Gp₂G; 18, Gp₅G; 19, Gp₅GpCp; 20, pCpGp₅GpCp; 21, Ap₄X; 22 and 22', Ap₄GpCp or Gp₄ApCp; 23, Ap₄ApCp; 24, Xp₄X.

RESULTS AND DISCUSSION

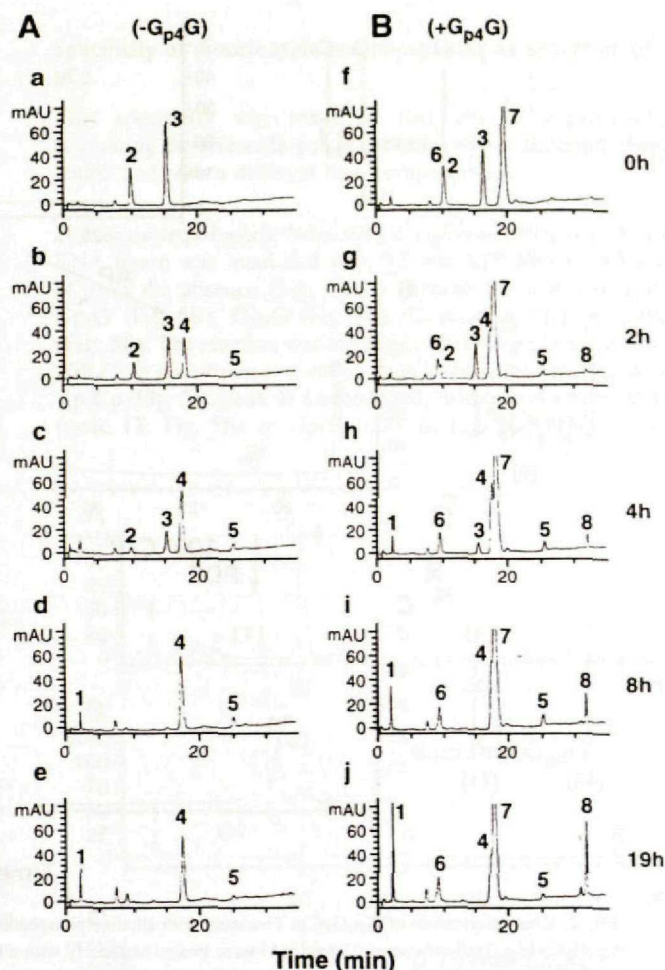
Diguanosine tetraphosphate as a potential RNA acceptor

The rationale for this experiment was to test whether the intermediate E–AppCp, formed in the presence of ATP and pCp [3], was able to donate its pCp residue to a 3'-OH group of Gp₄G. Accordingly, reaction mixtures were set up containing 0.5 mM ATP and 0.5 mM pCp (as an RNA donor) in the absence (Fig. 1A, a–e) and presence of 1 mM Gp₄G (Fig. 1B, f–j) as a potential RNA acceptor. Reaction mixtures were analyzed after 0, 2, 4, 8 and 19 h. In the absence of Gp₄G, the expected Ap₂Cp (Fig. 1A, b–e, peak 4) was synthesized during the course of the reaction, concomitant with the disappearance of pCp (Fig. 1, peak 2) and ATP (Fig. 1, peak 3). In accordance with previously published results, small amounts (under these experimental conditions) of Ap₄A (Fig. 1A, b–e, peak 5) were also synthesized [8]. Preliminary characterization of Ap₂Cp (Fig. 1, peak 4) was based on its chromatographic position and UV spectrum (see below). In the presence of Gp₄G (Fig. 1B, f–j, peak 7), synthesis of Ap₂Cp (Fig. 1, g–j, peak 4) was also obtained, reaching a plateau at ≈ 4 h incubation. Thereafter, this peak decreased in parallel with the appearance of a new compound (Fig. 1B, h–j, peak 8), probably corresponding to a cytidylyl derivative of Gp₄G. These chromatograms also show the presence of another compound, Gp₃G (Fig. 1B, peak 6), migrating to the left of pCp. Gp₃G was a contaminant of the Gp₄G preparations.

Comparing the chromatograms on the left-hand side (absence of Gp₄G) with those on the right (presence of Gp₄G), the formation of AMP (peak 1) was more relevant in the second case, a consequence of using Ap₂Cp as a cytidylylation substrate, with liberation of AMP. The formation of AMP is due mainly to a catalytic phenomenon and not to the chemical degradation of Ap₂Cp. Under our experimental conditions, Ap₂Cp is a rather stable compound, with a calculated degradation rate of ≈ 0.3%·h⁻¹.

The nature of peak 8 was analyzed as detailed below.

Fig. 1. Synthesis of a cytidylyl derivative of diguanosine tetraphosphate catalyzed by T4 RNA ligase. The reaction mixtures (0.04 mL) contained 6.6 U of T4 RNA ligase, 0.5 mM ATP, 0.5 mM pCp, in the absence (A) or presence (B) of 1 mM Gp₄G and other components as indicated in Materials and methods. Aliquots were taken at the indicated times of incubation at 30 °C, and analyzed by HPLC using a Hypersil ODS column. The numbers above the chromatographic peaks correspond to the following compounds: 1, AMP; 2, pCp; 3, ATP; 4, Ap₂Cp; 5, Ap₄A; 6, Gp₃G; 7, Gp₄G; 8, Gp₄GpCp.



Synthesis and characterization of GppppG-3'-p-5'-C-3'-p (Gp₄GpCp) catalyzed by T4 RNA ligase

Here we show that peak 8 (Fig. 1) corresponds to Gp₄GpCp. In order to accumulate enough product, a reaction mixture similar to that shown in Fig. 1B, f, was set up in a volume of 0.3 mL, incubated for 22 h at 30 °C and applied into a MonoQ column. The column was eluted with a linear gradient of ammonium bicarbonate as described in Materials and Methods. Under those conditions, two major peaks with retention times of 12.5 min (Gp₄G) and 15.4 min were resolved with the 0.5–1 M gradient of NH₄HCO₃ (results not shown). The later peak, presenting a UV spectrum identical to that of peak 8, was concentrated by lyophilization.

A chromatogram of the purified compound (peak 8) is shown in Fig. 2A. Its characterization was assessed by chromatographic analysis of the products formed after treatment with alkaline phosphatase and/or snake venom phosphodiesterase and by comparing the UV spectrum of peak 8 with those of its degradation products and the corresponding standards (Fig. 3).

The UV spectrum of peak 8 corresponded to a compound containing 2 mol of G and 1 mol of C (Fig. 3). Following treatment with alkaline phosphatase, peak 8 changed its chromatographic position (Fig. 2B, peak 9), maintaining its

UV spectrum, compatible with the removal of a terminal phosphate from the cytidylyl derivative of Gp₄G (Fig. 2A,B and Fig. 3). After heating at 100 °C to inactivate the phosphatase, the mixture was supplemented with snake venom phosphodiesterase. The presumptive Gp₄GpC (peak 9; Fig. 2B) can be hydrolyzed by this enzyme in the positions indicated by the arrows, generating a mixture of intermediate products (pC, pG, Gp₄G, pppGpC, pppG), and pC and pG as the final products of the reaction. Accordingly, under our experimental conditions only pC (peak 10) and pG (peak 11) were found after extensive treatment with phosphodiesterase (Fig. 2C).

Another aliquot of peak 8 was initially treated with snake venom phosphodiesterase. As this enzyme requires a nucleoside 5'-phosphoryl residue with a free 3'-OH group, the two main products obtained probably correspond to pG (peak 11) and p₃GpCp (peak 12; Fig. 2D). Inactivation of the phosphodiesterase and further treatment of the reaction mixture with alkaline phosphatase, gave two peaks that corresponded to the expected Guo (peak 13) and GpC (peak 14; Fig. 2E).

Identification of the reaction products was assessed by coelution with standards (Guo, pC, pG, Gp₄G, GpC) and by UV spectra (Fig. 3). The spectra of compounds containing G only (peaks 11 and 13 in Fig. 2), 2G + 1C (peaks 8 and 9 in Fig. 2).

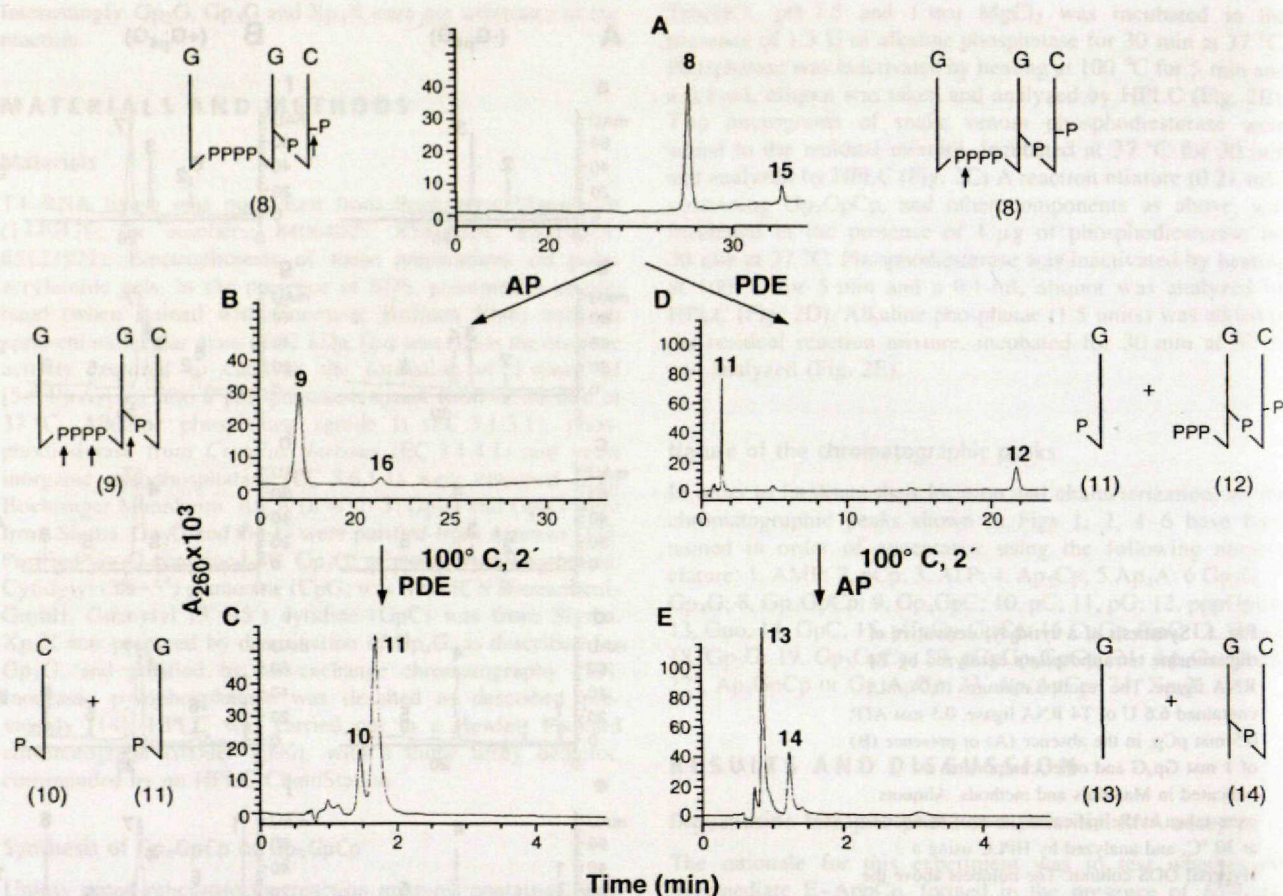


Fig. 2. Characterization of Gp_4GpCp . Treatment with alkaline phosphatase and phosphodiesterase. Two reaction mixtures containing 0.057 A_{260} units of Gp_4GpCp in a final volume of 0.21 mL (A) were treated separately with alkaline phosphatase (AP) (B) followed by phosphodiesterase (PDE) (C), or with PDE (D) followed by AP (E) as described in Materials and methods. Analysis of the reaction products was carried out by HPLC using a Hypersil ODS column. The numbers above the chromatographic peaks correspond to the following compounds: 8, Gp_4GpCp ; 9, Gp_4GpC ; 10, pC ; 11, pG ; 12, $pppGpCp$; 13, Guo ; 14, GpC ; 15, $pCpGp_4GpCp$; 16 $CpGp_4GpCp$.

1G + 1C (peaks 12 and 14 in Fig. 2) or C only (peak 10 in Fig. 2), could easily be distinguished and were of great help in elucidating predicted structures.

The nature of Gp_4GpCp (Fig. 2, peak 8) was also established by treatment of an aliquot with 0.6 M KOH for 18 h, at 37 °C. After neutralization of the reaction mixture with perchloric acid and chromatography on a Hypersil ODS column, two major peaks (Cp and Gp_4Gp) and one small peak (Gp_4G) were recovered, in accordance with the preferential cleavage of 3'-5'-phosphodiester bonds by this procedure. After treatment of the reaction mixture with alkaline phosphatase, two major peaks corresponding to Gp_4G and cytidine, and a small peak of guanosine were obtained (results not shown).

In our view, the above results show that T4 RNA ligase is able to catalyze the synthesis of Gp_4GpCp using ATP, pCp and Gp_4G as cosubstrates.

Synthesis of p-3'-C-5'-p-3'-GppppG-3'-p-5'-C-3'-p ($pCpGp_4GpCp$)

A minor peak (peak 15) migrating to the right of Gp_4GpCp was also observed after column chromatography of reaction mixtures containing 0.5 mM ATP, 0.5 mM pCp and Gp_4G

(Figs 2, 4 and 5). The ratio of the areas of peak 8 to peak 15, although dependent on the experimental conditions, was ≈ 10 . This low rate of synthesis made it difficult to obtain enough material of peak 15 to perform a characterization similar to that performed for Gp_4GpCp . Nevertheless, peak 15 was assumed to be a Gp_4G moiety containing 1 mol of pCp attached to both 3'-OH groups, e.g. $pCpGppppGpCp$, for the following reasons: treatment with alkaline phosphatase gave a compound with a shorter retention time (Fig. 2B, peak 16) but the same UV spectrum; the UV spectra of peaks 15 and 16 were compatible with the occurrence of 2 mol of G and 2 mol of C in the same molecule (Fig. 3C).

Synthesis of Gp_4GpCp : dependence on the concentration of Gp_4G and Ap_2Cp

The dependence on the concentration of Gp_4G was analyzed as follows. Reaction mixtures containing 1 mM ATP-Mg, 1 mM pCp and 5 mM $MgCl_2$ were incubated in the presence of enzyme for 3 h at 30 °C, to achieve complete transformation of both substrates into Ap_2Cp . Thereafter, the reaction mixtures were supplemented separately with variable concentrations of Gp_4G (0, 0.25, 0.75, 2 and 4 mM), and product formation was

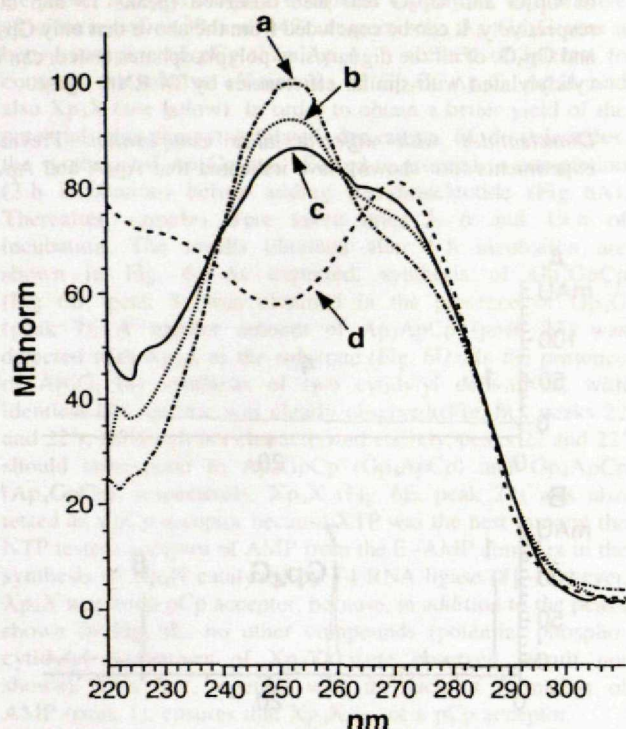


Fig. 3. Ultraviolet spectra of Gp₄GpCp and their degradation products following treatment with alkaline phosphatase and phosphodiesterase. The UV spectra, recorded from the indicated chromatographic peaks correspond to compounds containing: (a) G only (peaks 11 and 13); (b) 2G + 1C (peaks 8 and 9); (c) 1G + 1C (peaks 12 and 14) and (d) C only (peak 10). The nature of the chromatographic peaks is as indicated in Figs 1, 2, 4 and 5 and in Materials and methods.

analyzed by HPLC after 3 h and 6 h of further incubation. The amount of Gp₄GpCp formed after 6 h was almost double that obtained after 3 h. The results obtained after 3 h incubation were used to calculate the K_m value for Gp₄G. The amount of Gp₄G consumed was <8% in all cases, and that of Ap₂Cp reached 17% in the presence of 4 mM Gp₄G (Fig. 4). Under these conditions, an apparent K_m value of 4 mM was determined for Gp₄G. Note (Fig. 4) that when the concentration of Gp₄G increases its chromatographic peak overlaps with that of Ap₂Cp and the contaminating Gp₃G, present in the sample of Gp₄G, becomes more apparent in the HPLC profiles of the reaction mixtures (Fig. 4, peak 6).

The dependence of the reaction catalyzed by T4 RNA ligase on the concentration of Ap₂Cp (equivalent to that of ATP + pCp) was analyzed in reaction mixtures (0.04 mL) containing variable concentrations (0.25, 0.5, 1 and 2 mM) of ATP-Mg and pCp. 5 mM MgCl₂ and 8 U of enzyme. After incubation for 3 h, to preform Ap₂Cp, each mixture was supplemented with 2 mM of Gp₄G and the synthesis of Gp₄GpCp was analyzed after 1.5 and 3 h of further incubation. The reaction was linear with time. An apparent K_m of ≈ 0.4 mM for the substrate Ap₂Cp was calculated from the results obtained after 1.5 h incubation. Under these conditions the amount of Ap₂Cp consumed was <10% (results not shown).

Apparent K_m values of ≈ 0.7 and 2.1 mM have been reported previously when pdTp and dA(pdA)₄ were used as donor and acceptor, respectively [15].

Specificity of dinucleoside polyphosphates as acceptors of pCp

This specificity was tested in two sets of experiments, comparing dinucleoside polyphosphates with a different chain length and with a different base composition.

Diguanosine polyphosphates with a different chain length. T4 RNA ligase was incubated with 0.5 mM ATP-MgCl₂, 0.5 mM pCp, in the absence (Fig. 5A) or presence of 1 mM each of Gp₂G (Fig. 5B), Gp₃G (Fig. 5C), Gp₄G (Fig. 5D) or Gp₅G (Fig. 5E). The reaction was incubated for 15 h and analyzed by HPLC. In the absence of added dinucleotide, total synthesis of Ap₂Cp (Fig. 5A, peak 4) was obtained. Addition of either Gp₂G (peak 17; Fig. 5B) or Gp₃G (peak 6; Fig. 5C) produced no

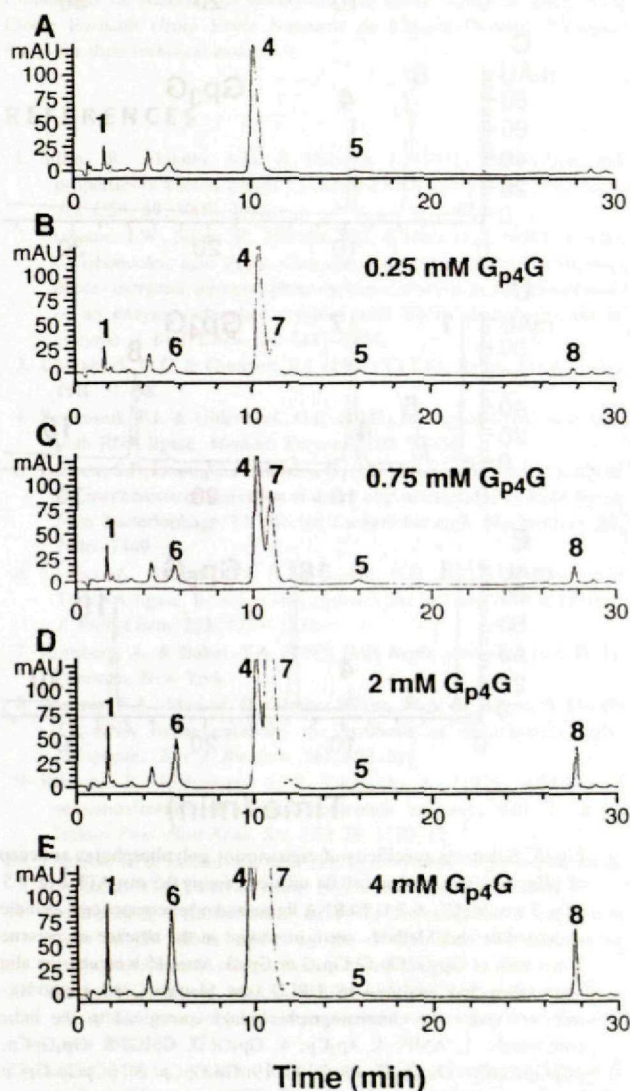


Fig. 4. Influence of Gp₄G concentration on the synthesis of their cytidyl derivatives. Reaction mixtures (0.04 mL) containing 1 mM ATP-Mg, 1 mM pCp, 5 mM MgCl₂, 8 U T4 RNA ligase were incubated for 3 h at 30 °C. At that time, variable concentrations (mM) of Gp₄G [0 (A), 0.25 (B), 0.75 (C), 2 (D) and 4 (E)] were added and the reaction was analyzed by HPLC after 3 h of further incubation (see Materials and methods). The numbers above the chromatographic peaks correspond to the indicated compounds: 1, AMP; 4, Ap₂Cp; 5, Ap₃A; 6, Gp₃G; 7, Gp₄G; 8, Gp₄GpCp.

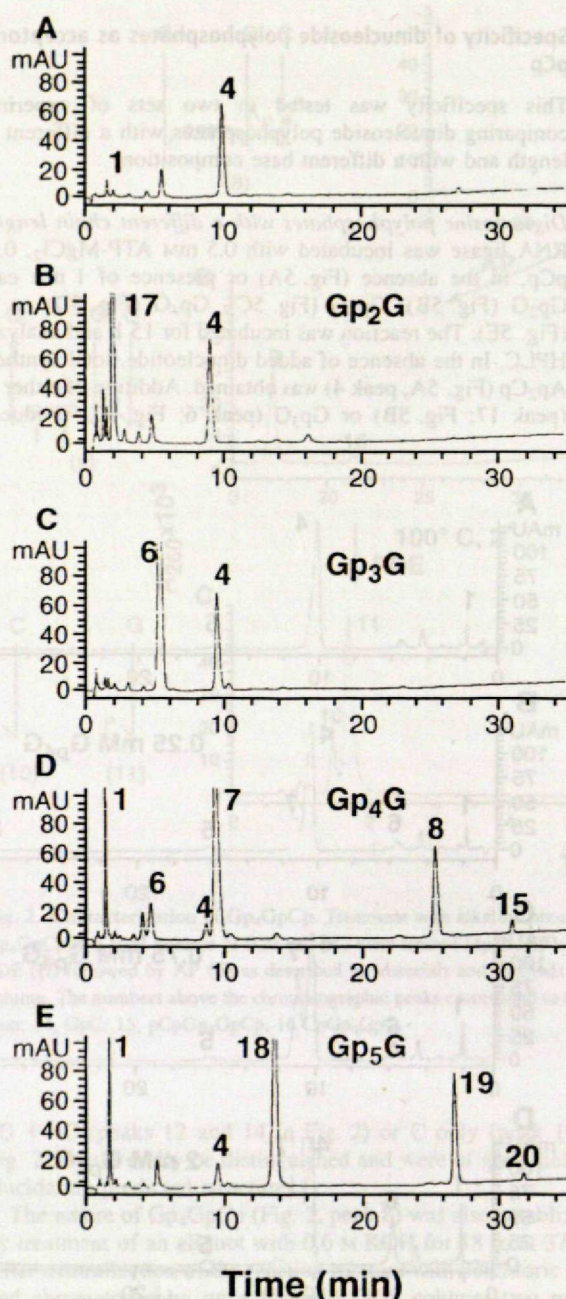


Fig. 5. Substrate specificity of diguanosine polyphosphates as acceptors of pCp. Reaction mixtures (0.04 mL) containing 0.5 mM ATP-Mg, 0.5 mM pCp, 5 mM $MgCl_2$, 6.7 U T4 RNA ligase and other components as indicated in Materials and Methods, were incubated in the absence or presence of 1 mM each of Gp₂G, Gp₃G, Gp₄G or Gp₅G. After 15 h incubation aliquots were taken and analyzed by HPLC (see Materials and methods). The numbers above the chromatographic peaks correspond to the indicated compounds: 1, AMP; 4, Ap₂Cp; 6, Gp₃G; 7, Gp₄G; 8, Gp₄GpCp; 15, pCpGp₄GpCp; 17, Gp₂G; 18, Gp₅G; 19, Gp₅GpCp; 20, pCpGp₅GpCp.

significant decrease in Ap₂Cp (peak 4) or increase in AMP (peak 1), or the appearance of phospho-cytidylated derivatives of those diguanosine polyphosphates. In contrast, addition of Gp₄G (peak 7) or Gp₅G (peak 18) promoted the synthesis of Gp₄GpCp (Fig. 4D, peak 8) and Gp₅GpCp (Fig. 4E, peak 19). A small synthesis of the bis-phospho-cytidylated derivatives

of Gp₄G and Gp₅G was also observed (peaks 15 and 20), respectively. It can be concluded from the above that only Gp₄G and Gp₅G, of all the diguanosine polyphosphates tested, can be cytidylated with similar efficiencies by T4 RNA ligase.

Dinucleotides with different base composition. Previous experiments (not shown) have indicated that Ap₄A and Ap₅A

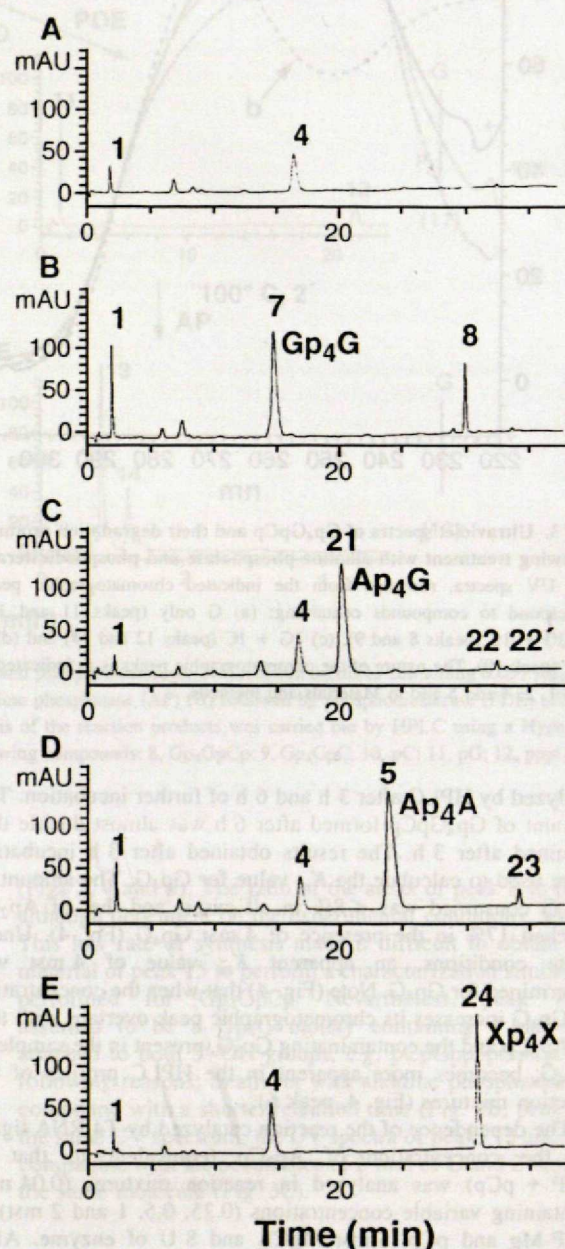


Fig. 6. Substrate specificity of dinucleoside tetraphosphates as acceptors of pCp. Reaction mixtures (0.03 mL) containing 0.5 mM ATP-Mg, 0.5 mM pCp, 5 mM $MgCl_2$, 6.7 U T4 RNA ligase and other components as indicated in Materials and methods, were incubated in the absence or presence of 1 mM each of Gp₂G, Ap₄G, Ap₄A or Xp₄X. After 6 h incubation aliquots were taken and analyzed by HPLC (see Materials and methods). The numbers above the chromatographic peaks correspond to the indicated compounds: 1, AMP; 4, Ap₂Cp; 5, Ap₄A; 7, Gp₄G; 8, Gp₄GpCp; 21, Ap₄G; 22 and 22', Ap₄GpCp (Gp₄ApCp) and Gp₂ApCp (Ap₂GpCp), respectively; 23, Ap₄ApCp; 24, Xp₄X.

are poorer acceptors of pCp, compared with Gp₄G, with relative efficiencies of ≈ 30 and 14%, respectively. As Gp₄G was a better acceptor of pCp than Ap₄A, it seemed of interest to compare the relative efficiencies of Gp₄G, Ap₄G, Ap₄A and also Xp₄X (see below). In order to obtain a better yield of the potential phospho-cytidylylated derivatives of dinucleotides, the synthesis of Ap₂Cp was allowed to proceed to completion (2 h incubation) before adding the dinucleotide (Fig. 6A). Thereafter, samples were taken after 3, 6 and 19 h of incubation. The results obtained after 6 h incubation are shown in Fig. 6. As expected, synthesis of Gp₄GpCp (Fig. 6B, peak 8) was obtained in the presence of Gp₄G (peak 7). A smaller amount of Ap₄ApCp (peak 23) was detected with Ap₄A as the substrate (Fig. 6D). In the presence of Ap₄G, the synthesis of two cytidylyl derivatives, with identical UV spectra, was clearly observed (Fig. 6C, peaks 22 and 22'). Although not characterized entirely, peaks 22 and 22' should correspond to Ap₄GpCp (Gp₄ApCp) and Gp₄ApCp (Ap₄GpCp), respectively. Xp₄X (Fig. 6E, peak 24) was also tested as a pCp acceptor because XTP was the best (among the NTP tested) acceptor of AMP from the E-AMP complex in the synthesis of Ap₄N catalyzed by T4 RNA ligase [8]. However, Xp₄X was not a pCp acceptor, because, in addition to the peaks shown in Fig. 6E, no other compounds (potential phospho-cytidylyl derivatives of Xp₄X) were observed (result not shown). This fact, together with the lack of formation of AMP (peak 1), ensures that Xp₄X is not a pCp acceptor.

CONCLUDING REMARKS

Previous reports have shown that some dinucleoside polyphosphates of the type (Np_nN) behave as acceptors for the following polymerases: RNA polymerase [16], DNA polymerase [17], (2',5') oligo(A) polymerase [18] and poly(ADP-ribose) polymerase [19–21]. There are also several publications relating dinucleoside polyphosphates to T4 RNA ligase. Dinucleoside pyrophosphate derivatives (A5'pp5'RNA) are synthesized as intermediates of the RNA joining reactions in the presence of ATP and RNA (reaction 2) [3,4,6]; a variety of dinucleoside pyrophosphates (A5'pp5'X) were found to be donors of the pX portion to (Ap)₃C in an AMP-independent reaction catalyzed by T4 RNA ligase; Ap₃G was much less efficient as a donor than dinucleoside pyrophosphates [22]. Because a trinucleoside diphosphate (NpNpN) is the minimal RNA acceptor, it was thought unlikely that cap structures (methyl derivatives of Gp₃G) could be substrates of T4 RNA ligase [23].

Here we show for the first time that T4 RNA ligase can use dinucleoside polyphosphates as pCp (RNA) acceptors. The enzyme discriminates between dinucleotides containing the same number of inner phosphates (Gp₄G, Ap₄G, Ap₄A and Xp₄X) and between homodinucleotides containing a different chain of inner polyphosphates (Gp₂G, Gp₃G, Gp₄G and Gp₅G). The enzyme prefers guanine to adenine or xanthine dinucleotides and requires a minimum of four inner phosphates. This substrate specificity is in one sense more strict than that exhibited by two enzymes specifically hydrolyzing dinucleoside polyphosphates: dinucleoside triphosphatase [13,24], an enzyme that specifically recognizes dinucleoside triphosphates as substrates, regardless of the type of base (except xanthine), and dinucleoside tetrakisphosphatase [24,25], which preferentially recognizes dinucleotides with four inner phosphates, also irrespective of type of base. The capacity to distinguish Gp₄G from both Gp₃G and Gp₅G, seems to be a new and uncommon characteristic of T4 RNA ligase in relation to the above

enzymes. The molecular basis for this behavior is not known at present. As very little is known about the function of the enzyme itself, a role for diguanosine polyphosphates, via T4 RNA ligase, in the life cycle of T4 phage could be contemplated. It is also known that the only phenotype attributed to mutations in T4 gene 63, coding for T4 RNA ligase, is the failure of the noncovalent attachment of the tail fibers, leading to fiberless T4 particles [26]. In the process of T4 phage morphogenesis, the enzyme may recognize certain motives of the phage proteins resembling the Gp₄G/Gp₅G structures, disclosed by chance in the experiments reported here.

ACKNOWLEDGEMENTS

This investigation was supported by grants from the Dirección General de Investigación Científica y Técnica (PM95/0013; PM98-0129) and Comunidad de Madrid (08.9/0004/98). We thank Isabel de Diego and Elodie Barnault (from Ecole Nationale de Chimie Physique-Biologie, Paris) for their technical assistance.

REFERENCES

- Silber, R., Malathi, V.G. & Hurwitz, J. (1972) Purification and properties of bacteriophage T4-induced RNA ligase. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **69**, 3009–3013.
- Cranston, J.W., Silber, R., Malathi, V.G. & Hurwitz, J. (1974) Studies on ribonucleic acid ligase. Characterization of an adenosine triphosphate-inorganic pyrophosphate exchange reaction and demonstration of an enzyme-adenylate complex with T4 bacteriophage-induced enzyme. *J. Biol. Chem.* **249**, 7447–7456.
- Uhlenbeck, O.C. & Gumpert, R.I. (1982) T4 RNA ligase. *The Enzymes* **15B**, 31–58.
- Romaniuk, P.J. & Uhlenbeck, O.C. (1983) Joining of RNA molecules with RNA ligase. *Methods Enzymol.* **100**, 52–59.
- Harnett, S.P., Lowe, G. & Tansley, G. (1985) A stereochemical study of the mechanism of activation of donor oligonucleotides by RNA ligase from bacteriophage T4 infected *Escherichia coli*. *Biochemistry* **24**, 7446–7449.
- Sugino, A., Snopek, T.J. & Cozzarelli, N.R. (1977) Bacteriophage T4 RNA ligase. Reaction intermediates and interaction of substrates. *J. Biol. Chem.* **252**, 1733–1738.
- Kornberg, A. & Baker, T.A. (1992) *DNA Replication*, 2nd edn. W. H. Freeman, New York.
- Atencia, E.A., Madrid, O., Günther Sillero, M.A. & Sillero, A. (1999) T4 RNA ligase catalyzes the synthesis of dinucleoside polyphosphates. *Eur. J. Biochem.* **261**, 802–811.
- Kikuchi, Y., Hishinuma, F. & Sakaguchi, K. (1978) Addition of mononucleotides to oligoribonucleotide acceptors with T4 RNA ligase. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **75**, 1270–1273.
- England, E. & Uhlenbeck, O.C. (1978) Enzymatic oligoribonucleotide synthesis with T4 RNA ligase. *Biochemistry* **17**, 2069–2076.
- Kaufmann, G. & Kallenbach, N.R. (1975) Determination of recognition sites of T4 RNA ligase on the 3'-OH and 5'-P termini of polyribonucleotide chains. *Nature* **254**, 452–454.
- Vallejo, C.G., Sillero, M.A.G. & Sillero, A. (1974) Diguanosine tetraphosphate guanylohydrolase in *Artemia salina*. *Biochim. Biophys. Acta* **358**, 117–125.
- Sillero, M.A.G., Villalba, R., Moreno, A., Quintanilla, M., Lobatón, C.D. & Sillero, A. (1977) Dinucleosidetriphosphatase from rat liver: purification and properties. *Eur. J. Biochem.* **76**, 331–337.
- Fontes, R., Günther Sillero, M.A. & Sillero, A. (1998) Acyl-CoA synthetase from *Pseudomonas fragi* catalyzes the synthesis of adenosine 5'-polyphosphates and dinucleoside polyphosphates. *J. Bacteriol.* **180**, 3152–3158.
- Hinton, D.M., Baez, J.A. & Gumpert, R.I. (1978) T4 RNA ligase joins 2'-deoxyribonucleoside 3',5'-bisphosphates to oligodeoxyribonucleotides. *Biochemistry* **17**, 5091–5097.

16. Konarska, M.M., Padgett, R.A. & Sharp, P.A. (1984) Recognition of cap structure in splicing *in vitro* of mRNA precursors. *Cell* **38**, 731–736.
17. Zamecnik, P.C., Rapaport, E. & Baril, E.F. (1982) Priming of DNA synthesis by diadenosine 5',5'''-P¹,P⁴-tetrphosphate with a double-stranded octadecamer as a template and DNA polymerase α . *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **79**, 1791–1794.
18. Minks, M.A., Benven, S. & Baglioni, C. (1980) Mechanism of pppA (2'p5A)_n2'p5'A_{OH} synthesis in extracts of interferon-treated HeLa cells. *J. Biol. Chem.* **255**, 5031–5035.
19. Yoshihara, K. & Tanaka, Y. (1981) ADP-ribosylation of diadenosine 5',5'''-P¹,P⁴ tetrphosphate by poly(ADP-ribose) polymerase *in vitro*. *J. Biol. Chem.* **256**, 6756–6761.
20. Sillero, M.A.G. & Cameselle, J.C. (1992) Interaction of dinucleoside polyphosphates with enzymes and other proteins. In *Ap₄A and Other Dinucleoside Polyphosphates* (McLennan, A.G., ed.), pp. 205–228. CRC Press, Boca Raton, FL.
21. Kisselev, L.L., Justesen, J., Wolfson, A.D. & Frolova, L.Y. (1998) Diadenosine oligophosphates (Ap_nA), a novel class of signalling molecules? *FEBS Lett.* **427**, 157–163.
22. England, T.E., Gumpert, R.I. & Uhlenbeck, O.C. (1977) Dinucleoside pyrophosphates are substrates for T4-induced RNA ligase. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **74**, 4839–4842.
23. England, T.E. & Uhlenbeck, O.C. (1978) 3'-Terminal labelling of RNA with T4 RNA ligase. *Nature* **275**, 560–561.
24. Guranowski, A. & Sillero, A. (1992) Enzymes cleaving dinucleoside polyphosphates. In *Ap₄A and Other Dinucleoside Polyphosphates* (McLennan, A.G., ed.), pp. 81–133. CRC Press, Boca Raton, FL.
25. Lobatón, C.D., Vallejo, C.G., Sillero, A. & Sillero, M.A.G. (1975) Diguanosinetetraphosphatase from rat liver: activity on diadenosine tetraphosphate and inhibition by adenosine tetraphosphate. *Eur. J. Biochem.* **50**, 495–501.
26. Runnels, J.M., Soltis, D., Hey, T. & Snyder, L. (1982) Genetic and physiological studies of the role of the RNA ligase of bacteriophage T4. *J. Mol. Biol.* **154**, 273–286.

